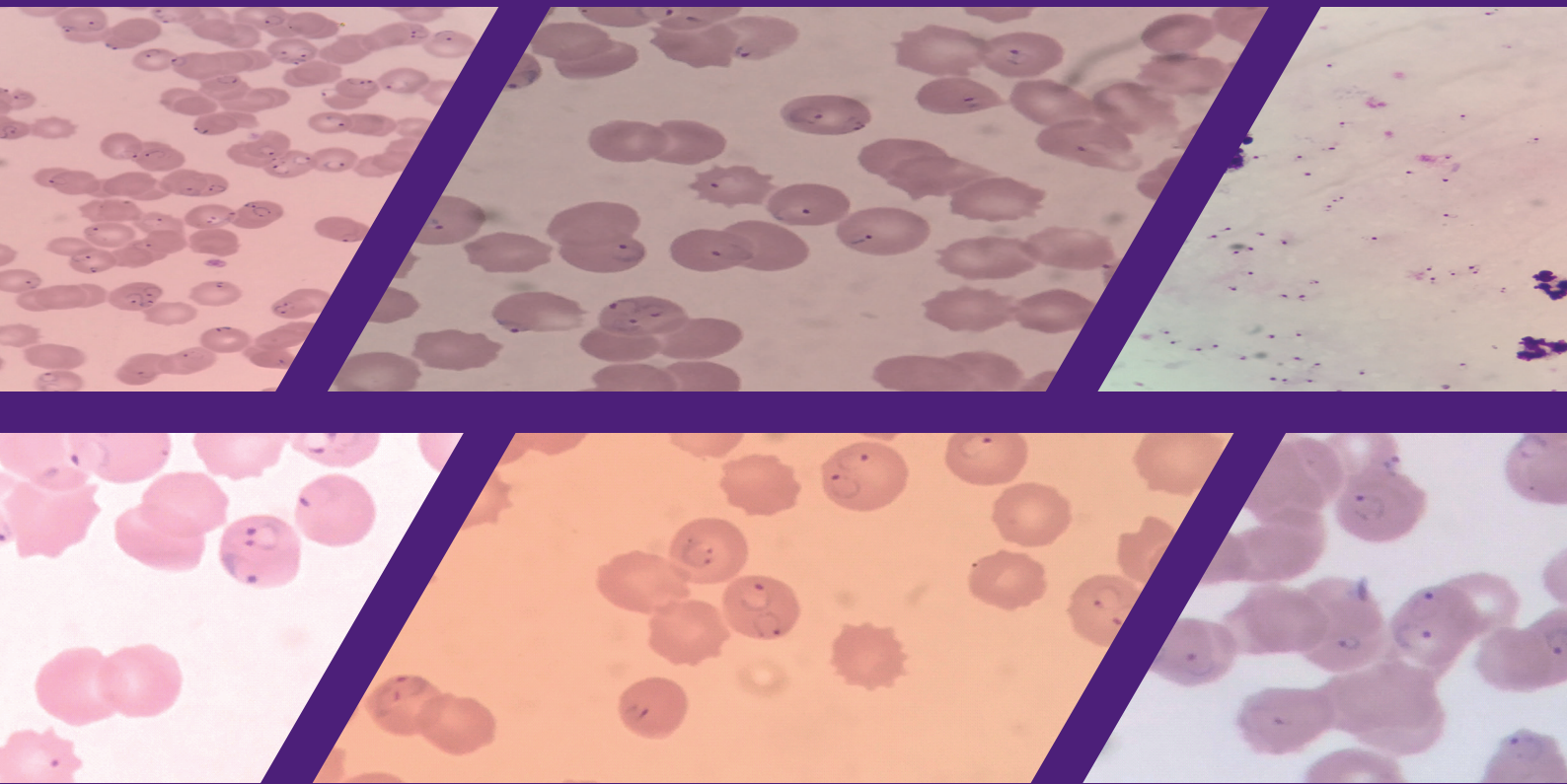




MINISTERIO DE  
**SALUD PÚBLICA  
Y BIENESTAR SOCIAL**



# GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA POR LABORATORIO



**PARAGUAY - 2017**





# **MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL**

## **AUTORIDADES**

**Dr. Antonio Barrios Fernández**

Ministro de Salud

**María Teresa Barán Wasilchuk**

Viceministra de Salud

**Dr. Gustavo Chamorro Cortesi**

Director General del Laboratorio Central de Salud Pública

**Dr. Nicolás Aguayo**

Director General del Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo  
(SENEPA)

**Dra. Águeda Cabello**

Directora General de Vigilancia de la Salud

**Dr. Raúl Latorre**

Director General de Desarrollo de Servicios de Salud

## Catalogado por la Biblioteca del LCSP

Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Laboratorio Central de Salud Pública. **Guía para el diagnóstico de Malaria por Laboratorio.** Asunción: OIM, Fondo Mundial de Lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria, 2017. 93 p.

**ISBN 978-99967-36-41-4**

**I. MALARIA. II. DIAGNÓSTICO. III. GUÍA. IV. TÉCNICAS DE LABORATORIO CLÍNICO. 1. Paraguay.**

### **APOYO TÉCNICO:**

#### **Laboratorio Central de Salud Pública**

Dra. Natalie Weiler

Dr. Andrés Canese

Dra. Maria del Carmen Almada

Dra. Regina Codas

#### **Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo**

Dra. Mónica Ozorio

Tec. Beatriz Trinidad

Lic. Cynthia Viveros

#### **Coordinación, Redacción Y Recopilación:**

Bioq. Claudia Huber Schill

#### **Edición y diagramación**

Lic. Felicita Duré Pérez

Lic. Azucena Melgarejo Sanabria

### **APOYO FINANCIERO:**

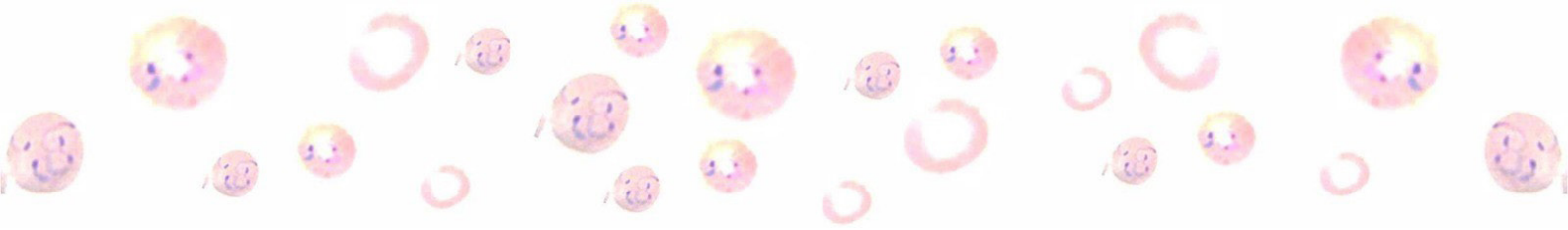
El Fondo Mundial de lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria

Organización Internacional para las Migraciones (OIM), como beneficiario principal

# CONTENIDO

<b>SIGLAS Y ABREVIATURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1: MALARIA, LA ENFERMEDAD .....</b>	<b>9</b>
1.1. Vías de transmisión .....	10
1.2. Manifestaciones clínicas.....	10
1.3. Inmunidad .....	11
1.4. El vector.....	12
1.5. Ciclo Biológico de la malaria .....	13
1.6. Epidemiología.....	15
1.7. Vigilancia Epidemiológica de malaria en el país .....	17
1.8. Diagnóstico clínico epidemiológico .....	18
1.9. Diagnóstico laboratorial .....	18
1.10. Tratamiento .....	20
<b>CAPÍTULO 2: PREPARACIÓN DE LA GOTA GRUESA Y EL FROTIS DELGADO .....</b>	<b>21</b>
2.1. Normas básicas de Bioseguridad.....	22
2.2. Obtención de la muestra de sangre.....	22
2.3. Cuidados y recomendaciones .....	25
2.4. Errores frecuentes en la preparación de las muestras .....	26
2.5. Transporte y envío de las muestras .....	26
<b>CAPÍTULO 3: COLORACIÓN DE LAS MUESTRAS.....</b>	<b>29</b>
3.1. Tinción de Giemsa .....	29
3.2. Técnica de coloración de las muestras .....	30
3.3. Recomendaciones para una buena coloración.....	31
3.4. Control de calidad de la coloración .....	31
<b>CAPÍTULO 4: OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA MUESTRA.....</b>	<b>33</b>
4.1. Examen de rutina de la gota gruesa y el frotis .....	33
<b>CAPÍTULO 5: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Plasmodium</i>.....</b>	<b>35</b>
5.1. Reconocimiento del parásito.....	35
5.2. Aspecto de los estadios del parásito .....	36
5.3. Aspectos de las diferentes especies de <i>Plasmodium</i> .....	37
5.4. Infección mixta .....	39
5.5. Artefactos .....	40
<b>CAPÍTULO 6: DENSIDAD PARASITARIA .....</b>	<b>41</b>
6.1. Estimación de la densidad parasitaria en la gota gruesa.....	41
6.2. Estimación de la densidad parasitaria en el frotis delgado .....	43
<b>CAPÍTULO 7: INFORME DE RESULTADOS E INTERPRETACIÓN .....</b>	<b>45</b>
7.1 Informe de resultados .....	45
7.2 Evaluación del tratamiento antimalárico.....	46

<b>CAPÍTULO 8: PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (PDR)</b> .....	<b>47</b>
8.1. Fundamento de las tiras rápidas .....	47
8.2. Antígenos detectados por las PDR.....	47
8.3. Uso e interpretación de resultados .....	48
8.4. Elección de la PDR .....	48
<b>CAPÍTULO 9: RED NACIONAL DE LABORATORIO</b> .....	<b>51</b>
9.1. Principales funciones de los laboratorios en el diagnóstico de malaria .....	51
9.2. Actividades a realizar en relación a las funciones del LCSP .....	54
9.3. La RNL en el diagnóstico de malaria .....	54
9.4. Supervisión de los laboratorios de la RNL .....	58
<b>CAPÍTULO 10: CONTROL DE CALIDAD</b> .....	<b>59</b>
10.1. Control de Calidad Interno .....	59
10.2. Control de Calidad Indirecto.....	60
10.3. Control de calidad directo .....	64
10.4. Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) .....	66
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>71</b>
ANEXO I. Limpieza de láminas .....	73
ANEXO II. Preparación de Reactivos .....	74
ANEXO III. Toma de muestra de sangre venosa.....	76
ANEXO IV. Toma de muestra en papel de filtro .....	78
ANEXO V. Cuidado, limpieza y mantenimiento del microscopio.....	79
ANEXO VI. Fichas de uso en el laboratorio .....	80
ANEXO VII. Imágenes.....	87



## SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>DGVS:</b>	Dirección General de Vigilancia de la Salud
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ENO:</b>	Eventos de Notificación Obligatoria
<b>HRP II:</b>	Proteína Rica en Histidina II
<b>LCSP:</b>	Laboratorio Central de Salud Pública
<b>LRN:</b>	Laboratorio de Referencia Nacional
<b>MSPBS:</b>	Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social
<b>OMS:</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS:</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>PBS:</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDR:</b>	Pruebas de diagnóstico rápido
<b>PEED:</b>	Programa de Evaluación Externa del Desempeño
<b>pLDH:</b>	Lactato deshidrogenasa parasitaria
<b>RNL:</b>	Red Nacional de Laboratorios
<b>SENEPA:</b>	Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo
<b>TCA:</b>	Tratamiento Combinado con Artemisina
<b>UDM:</b>	Unidad de Diagnóstico de Malaria
<b>CNE:</b>	Centro Nacional de Enlace
<b>UER:</b>	Unidad Epidemiológica Regional







## INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium*, cuya transmisión natural es mediante la picadura del mosquito *Anopheles* hembra. Los índices de morbilidad y mortalidad de esta patología superan a cualquier otra enfermedad parasitaria en el mundo, con cerca de la mitad de la población mundial en riesgo de contraerla (datos y cifras, OMS 2015).

En Paraguay, la malaria pasó de ser endémica en casi todo el territorio nacional en la década de los 50, a registrar el último caso autóctono en el año 2011, lo cual se consiguió mediante las estrategias implementadas por el Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo (SENEPA) en el control y eliminación de esta enfermedad.

La situación epidemiológica actual permite que el país se encuentre en proceso de certificación como país libre de malaria, con actividades destinadas a la prevención de la reintroducción y restablecimiento de la misma.

La amplia distribución del vector en el país y la presencia de casos importados por personas que residen o que viajaron a países endémicos, representan un riesgo para la reintroducción de esta enfermedad, para lo cual se necesita un sistema de vigilancia constante, donde la clave es el diagnóstico certero y precoz, para la posterior administración de un tratamiento eficaz, oportuno y que permita la implementación de las medidas de control que se consideren necesarias.

La técnica de diagnóstico de preferencia para esta patología es el examen microscópico de la gota gruesa, el cual permite diferenciar las especies de *Plasmodium*, los estadios presentes y determinar la parasitemia. El buen diagnóstico depende directamente de la calidad de la muestra obtenida y de la capacidad del microscopista, por lo tanto se debe contar con un personal entrenado, constantemente capacitado y monitoreado, con un sistema que asegure la calidad del diagnóstico.

La presente guía tiene como objetivo reforzar las capacidades del personal de laboratorio, aportando conceptos básicos y estableciendo procedimientos estandarizados para la realización y la observación microscópica de las muestras, a fin de uniformizar y optimizar el trabajo realizado en todos los laboratorios del país.



# CAPÍTULO I: MALARIA, LA ENFERMEDAD

El paludismo, malaria, fiebre veraniega o *akanundú ro'y* (en idioma guaraní), constituye una enfermedad de distribución mundial que afecta principalmente a las zonas tropicales o subtropicales de América, África y Asia, ocasionando, hasta hoy en día, la mayor cantidad de muertes producida por protozoarios en todo el mundo.

Los agentes de la malaria, parásitos del género *Plasmodium*, pertenecen al *Phyllum Apicomplexa* (CUADRO 1).

**CUADRO 1:** Clasificación de género *Plasmodium*.

<b>Phyllum:</b>	<i>Apicomplexa</i>
<b>Clase:</b>	<i>Sporozoea</i>
<b>Subclase:</b>	<i>Coccidia</i>
<b>Orden:</b>	<i>Eucoccidiida</i>
<b>Suborden:</b>	<i>Haemosporina</i>
<b>Familia:</b>	<i>Plasmodidae</i>
<b>Género:</b>	<i>Plasmodium</i>

Son muchas las especies de *Plasmodium* capaces de parasitar eritrocitos y células hepáticas de vertebrados, pero son solamente 4 las especies que tienen al ser humano como único reservorio efectivo: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*. Sin embargo, últimamente han ocurrido muchos casos humanos de malaria en Malasia y el sudeste asiático, debidos a *Plasmodium knowlesi*, parásito cuyos reservorios naturales son simios, por lo que puede ser considerada como la quinta especie de *Plasmodium* que afecta a las personas (CUADRO 2).

**CUADRO 2:** Especies de *Plasmodium* asociadas a la malaria en humanos

- *P. falciparum*
- *P. vivax*
- *P. ovale*
- *P. malariae*
- *P. knowlesi*

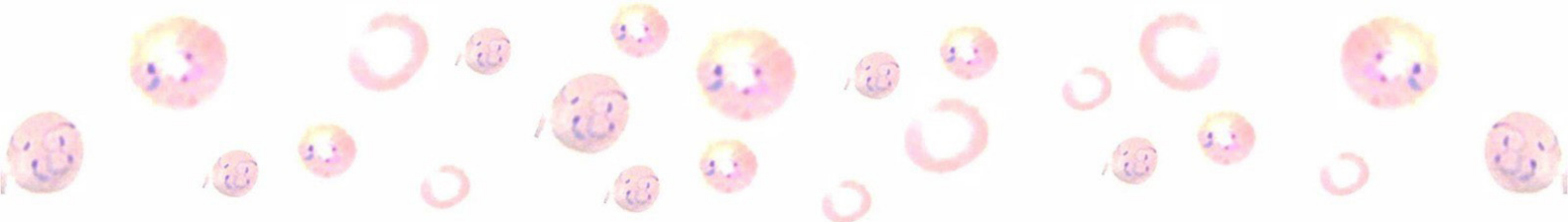
Especies de mayor importancia clínica y epidemiológica, responsables de más del 92% de todos los casos en el mundo.

*P. vivax* presenta una gran distribución geográfica en el mundo, por su habilidad de desarrollarse en el anofelino a bajas temperaturas, y su capacidad de sobrevivir a mayores altitudes y climas más fríos que *P. falciparum*. Además presenta un estadio latente en hígado (hipnozoito) que puede ser activado meses después de la infección inicial, produciendo recaídas.

*P. falciparum* es la especie de mayor distribución mundial (más del 50% de los casos), relacionada principalmente con climas más calurosos y húmedos, y principalmente en África.

*P. malariae* es una especie encontrada con baja frecuencia (alrededor del 7%).

*P. ovale* y *P. knowlesi* son especies muy poco frecuentes (menos del 1 %) y, si bien se han reportado casos autóctonos en varias partes del mundo, se encuentran muy circunscriptas a zonas endémicas limitadas. La principal zona endémica de *P. ovale* es la costa oeste de África y, al igual que *P. vivax*, tiene la habilidad persistir en hígado (hipnozoitos).



## I.1. VÍAS DE TRANSMISIÓN

La principal forma de transmisión de la malaria es la vectorial, la cual ocurre mediante la picadura de un mosquito del género *Anopheles* hembra infectado, donde se produce la inoculación de los esporozoitos (estadio del parásito que infecta al ser humano). No obstante también puede ocurrir, raramente, transmisión vertical del parásito, en la cual la madre embarazada infectada trasfiere las formas hemáticas del parásito al feto a través de la placenta. Otra forma es la vía transfusional, por inoculación directa, mediante la transfusión de eritrocitos infectados o por pinchazos accidentales con jeringas contaminadas.

## I.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

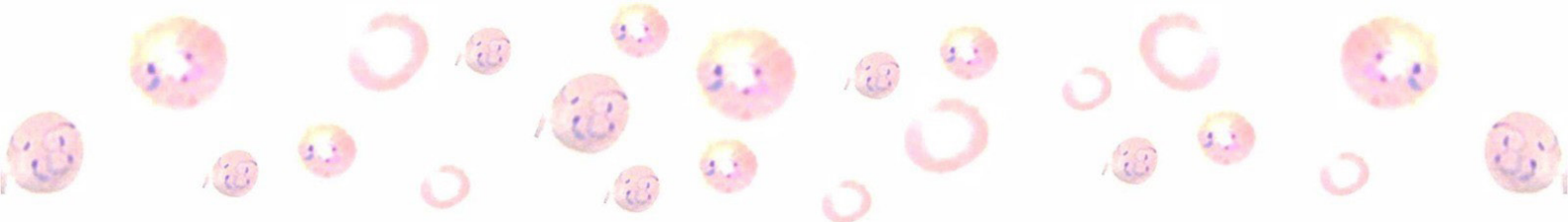
La malaria tiene un período de incubación variable de 8 a 37 días, dependiendo de la especie de *Plasmodium* involucrada y la resistencia del hospedador (TABLA 1).

TABLA 1: Características de la enfermedad				
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
<b>Periodo de incubación</b>	9 a 14 días	12 a 16 días	16 a 18 días	18 a 40 días
<b>Recaídas</b>	No existen	Si	Si	No existen
<b>Eritrocitos parasitados</b>	Todos	Jóvenes (Reticulocitos)	Jóvenes (Reticulocitos)	Viejos
<b>Aparición del acceso febril</b>	36 a 48 horas	48 horas	48 horas	72 horas
<b>Duración de la fiebre</b>	16 a 36 horas	8 a 12 horas	8 a 12 horas	8 a 10 horas

El cuadro clínico comienza con fiebre continua o irregular, acompañada de malestar general, dolor de cabeza intenso, dolor de espalda, náuseas y vómitos. Luego de unos días, la fiebre adquiere un ritmo característico con la aparición del llamado paroxismo malárico, el cual se caracteriza por un acceso febril que comienza con intenso escalofrío o chucho, debido al brusco ascenso de la temperatura, que alcanza los 39-41°C, con posterior descenso de la temperatura, que es también brusco, ocasionando sudoración intensa y sensación de mucho calor. Terminado el acceso febril, todo vuelve aparentemente a la normalidad, el paciente queda débil, pero tiene las fuerzas necesarias para realizar sus actividades diarias. El cuadro se repite cíclicamente cada 48 horas en las especies *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum* y, cada 72 horas en la especie *P. malariae*.

El paroxismo malárico está asociado al ciclo biológico del parásito en los eritrocitos y la fiebre aparece como consecuencia de la ruptura de los glóbulos rojos infectados, con la liberación consecuente de los trofozoitos al torrente sanguíneo. Mientras mayor sea la cantidad de glóbulos rojos infectados, más graves e intensos serán los síntomas.

En caso de que la enfermedad progrese, por falta de diagnóstico y tratamiento oportuno y eficaz, la parasitemia aumenta y el paciente puede manifestar una malaria severa, potencialmente letal, con uno o más de los siguientes síntomas: coma (malaria cerebral), acidosis metabólica, anemia severa, hipoglicemia, falla renal aguda, edema pulmonar agudo, hepatoesplenomegalia.



La intensidad de las manifestaciones clínicas depende de la especie de parásito infectante, del estado inmunológico del paciente y de la cantidad de parásitos circulantes en sangre. En niños, por lo general, la sintomatología es más grave y la fiebre se presenta de forma continua.

Los casos más severos están relacionados, en su gran mayoría, a infecciones por *P. falciparum*, y es la principal especie responsable de todas las muertes. La razón de la severidad se debe a la rápida multiplicación que presenta, a su capacidad para parasitar glóbulos rojos de todas las edades y a que, los eritrocitos parasitados por esta especie, tienen la característica de quedar secuestrado o adherirse al endotelio de los capilares sanguíneos. El taponamiento de la circulación sanguínea a ese nivel ocurre como consecuencia de la unión de los glóbulos rojos parasitados al endotelio capilar en los órganos profundos, lo cual puede producir insuficiencia renal aguda y falla multiorgánica, afectando pulmón, médula ósea, intestino, corazón u otro, relacionado además a la malaria cerebral. La oclusión de los capilares sanguíneos también puede ser producida por la formación de rosetas, que son acúmulos de eritrocitos parasitados recubiertos por eritrocitos no parasitados, como si fuese un pequeño émbolo, capaz de bloquear la microcirculación. Otro fenómeno que contribuye al taponamiento de la circulación de los capilares, es el hecho de que los eritrocitos parasitados pierden su capacidad de deformarse y de atravesar los espacios reducidos como la luz de los vasos sanguíneos más pequeños.

Se calcula que el más del 50% de los eritrocitos parasitados por estadios asexuales del *P. falciparum* producidos en cada ciclo eritrocítico se encuentran secuestrados en los capilares, por lo tanto no siempre son detectables al examinar la gota gruesa y pueden dar como consecuencia un resultado falso negativo, no así por las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR).

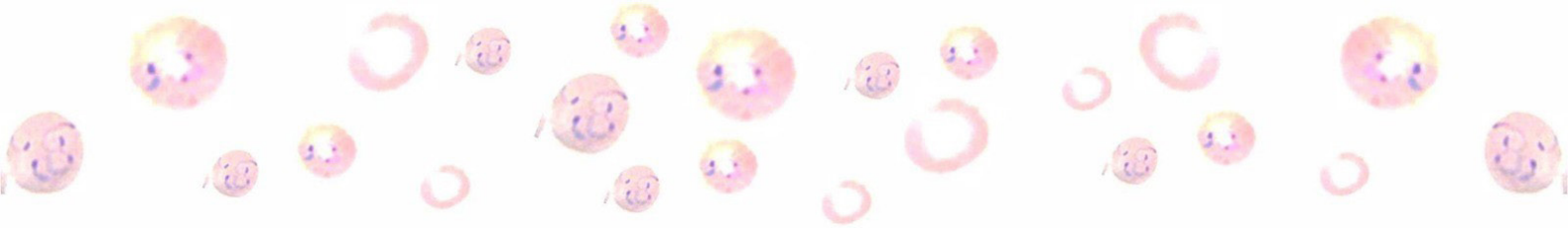
### I.3. INMUNIDAD

La inmunidad contra la malaria se establece de forma lenta, puede tardar incluso años en generarse, necesita de infecciones repetitivas, no es absoluta y no previene nuevas infecciones. Además, esta inmunidad es de corta duración y generalmente desaparece seis meses después que el paciente deje de estar expuesto a las infecciones constantes por éstos parásitos.

Una de las razones por las que la inmunidad frente a *Plasmodium* no es muy eficaz, es debido a que el sistema inmune se enfrenta a diferentes estadios del parásito durante el ciclo biológico. Otra razón es que no existe inmunidad cruzada entre las diferentes especies del género, es decir, la inmunidad es específica para cada especie.

Los individuos que residen en áreas endémicas logran una inmunidad específica parcial después de varios años de infecciones repetitivas, generalmente cuando llegan a edad adulta, y es por esto que la gran mayoría de los casos más graves en estas regiones ocurren en niños pequeños.

En los sujetos con inmunidad a *Plasmodium* en zonas endémicas, ocurre un fenómeno llamado premonición, que consiste en la tolerancia de las personas a los parásitos circulantes, estableciéndose un equilibrio orgánico relativo, donde los pacientes conviven con los parásitos, pero éstos se encuentran circulando en sangre periférica a bajas densidades. La inmunidad adquirida por estas personas también limita la respuesta inflamatoria frente al parásito, pudiendo presentar escasa sintomatología y pasar desapercibidos por el sistema de captación de casos, pero siguen actuando como portadores subclínicos o “sanos” y fuente potencial de transmisión del parásito al vector.



Se debe tener en cuenta que la presencia de esta inmunidad puede influir en el diagnóstico parasitológico de la enfermedad, por la aparición de bajas parasitemias, menores al límite de detección de las tiras rápidas e incluso la microscopía, por lo que son necesarias técnicas de detección más sensibles, como las técnicas de biología molecular.

## I.4. EL VECTOR

Existen más de 517 especies descritas del género *Anopheles*, de las cuales alrededor de 70 son consideradas como vectores naturales de las especies de *Plasmodium* capaces de producir la enfermedad en el ser humano.



**FIGURA 1:** Ejemplar de *Anopheles* adulto, reposa con el cuerpo (cabeza, tórax y abdomen) alineados, casi en ángulo recto, con la superficie. Sus alas presentan escamas oscuras y blanco-amarillentas en forma de pelos, dispuestas en formas de manchas.

El conocimiento de la biología de las especies de anofelinos es una parte importante del diagnóstico de la malaria, la presencia de algunas especies en un área de determinadas características influye sobre la posibilidad de ocurrencia de casos y, a la vez, los tiempos de desarrollo del parásito en el artrópodo intervienen sobre la probabilidad de realizar un diagnóstico correcto.

Las hembras del género *Anopheles* son las responsables de la transmisión, y pican a las personas para ingerir sangre, la cual es esencial para la maduración los huevos. La sucesión repetida de la ingesta de sangre, la formación de los huevos y la ovoposición se denomina ciclo gonotrófico. Los machos, sin embargo, se alimentan de la savia de los vegetales y del néctar de las flores y frutas. Al igual que los demás mosquitos, los anofelinos son insectos con metamorfosis completa, que abarca huevo, larvas (4 estadios), pupa y adultos. Solamente las formas adultas no son acuáticas y su ciclo en este medio es de 7-20 días, según la especie de anofelino y otros factores ambientales como la temperatura. Solamente las hembras adultas son capaces de actuar como vectores de la malaria y su vida media no suele ser mayor a 2 semanas, pudiendo vivir como máximo unos 30 días. Los machos viven aproximadamente una semana.

La mayoría de las especies del género *Anopheles* presentan costumbres crepusculares o nocturnas, es decir, son más activos desde la puesta del sol, hasta el amanecer. Durante el día buscan abrigo en lugares húmedos sin mucha luz. Los criaderos naturales del anofelino pueden ser ríos, arroyos, lagos, charcos temporales, agujeros de piedras, entre otros, y varían mucho según especie involucrada.

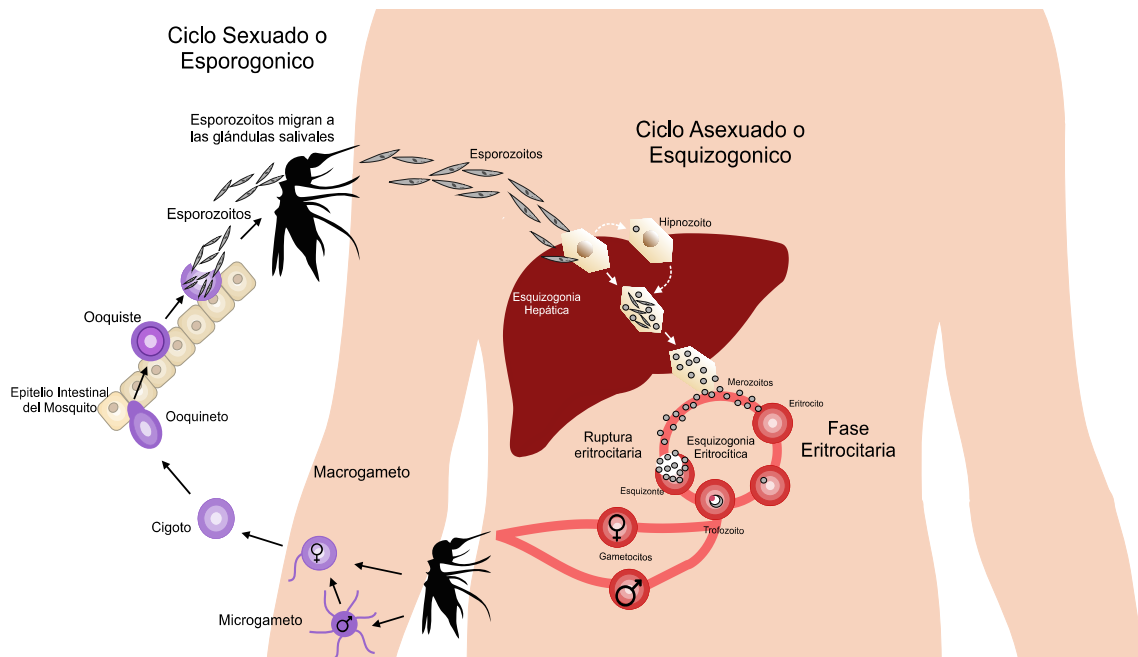
Las principales especies de *Anopheles* que pueden actuar como vectores de la malaria en el Paraguay son *An. darlingi* y el *An. albitarsis*. Si bien *An. albitarsis* es el de mayor predominio sobre las otras especies en el país, *An. darlingi* es el de mayor importancia en la transmisión, por sus

hábitos intradomiciliarios. *An. strodei* es la especie que les sigue en importancia a las anteriores. *An. darlingi* presenta una mayor abundancia en verano y otoño, siendo relativamente baja en invierno y primavera. *An. albitarsis* se caracteriza por ser más zoofílico, es decir, tiene preferencia por la sangre de animales.

## I.5. CICLO BIOLÓGICO DE LA MALARIA

Las especies de *Plasmodium*, que parasitan al ser humano, se desarrollan en dos fases o ciclos: asexual o esquizogónico y sexual o esporogónico (FIGURA 2). El ciclo asexual o esquizogónico, denominado también ciclo intrínseco, se desarrolla en el ser humano (hospedador intermediario) y el ciclo sexual o esporogónico, denominado también extrínseco, en mosquitos hembras del género *Anopheles* (hospedadores definitivos).

FIGURA 2: Ciclo biológico de *Plasmodium*.

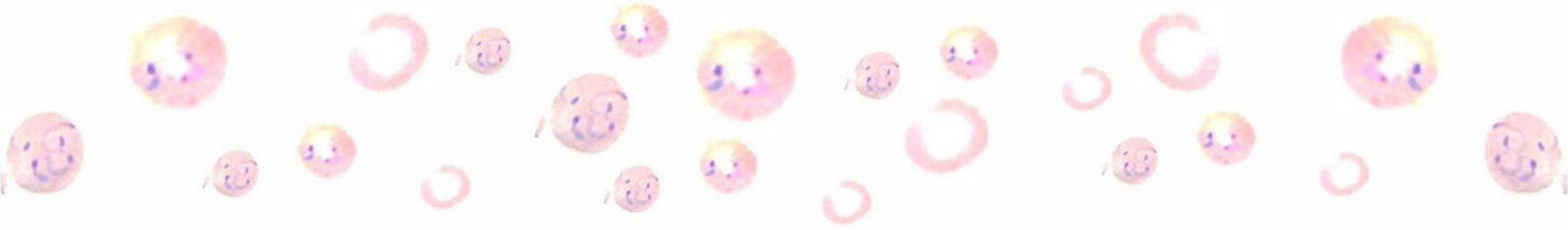


### Ciclo asexual o esquizogónico → En el ser humano (Ciclo intrínseco)

Se produce en 2 fases secuenciales: la fase preeritrocítica, llamada también esquizogonia hepática, y la fase esquizogónica eritrocítica.

**Fase Preeritrocítica:** Esta fase comienza con la picadura del *Anopheles* hembra infectado, inoculando los esporozoitos presentes en su saliva. Estos esporozoitos migran por la circulación sanguínea hasta llegar al hígado (en aproximadamente 30 a 60 minutos), donde invaden los hepatocitos.

Una vez dentro de las células hepáticas, los esporozoitos inician un proceso de reproducción esquizogónica, donde se desarrollan esquizontes con miles de merozoitos dentro, que al romperse las células hepáticas, son liberados al torrente sanguíneo. Se calcula que cada esquizonte hepático puede contener entre 10.000 a 30.000 merozoitos (dependiendo de la especie).



En los casos de *P. vivax* y *P. ovale*, algunas formas tisulares se desarrollan muy lentamente en el hígado (hipnozoítos) y pueden permanecer latentes por varios meses e incluso años. Cuando los merozoítos debido a ciclos esquizogónicos tisulares secundarios, originados por estos hipnozoítos, salen después de un tiempo a la circulación sanguínea, producen recaídas verdaderas en las personas. Esto no sucede con *P. falciparum* y *P. malariae*.

**Fase Eritrocítica:** Comienza con la entrada de los merozoítos tisulares a los hematíes. Una vez dentro, el parásito inicialmente adopta la forma de anillo, denominada trofozoíto con una vacuola central. El trofozoíto se alimenta de la hemoglobina del glóbulo rojo y crece, dejando residuos de su metabolismo, conocidos como pigmento malárico o hemozoína. El citoplasma de los trofozoítos se vuelve más irregular o ameboide, denominándose trofozoíto maduro. Finalmente el trofozoíto maduro adquiere una forma más compacta, su núcleo comienza a dividirse por esquizogonia, desarrollándose finalmente el esquizonte maduro, el cual presenta un número de núcleos que caracteriza a cada especie. Una vez culminada la división, los esquizontes maduros rompen los eritrocitos, liberando los merozoítos a la sangre. Estos merozoítos liberados reinician el ciclo esquizogónico eritrocítico al penetrar a nuevos hematíes.

Luego de aproximadamente unos 10 días del periodo prepatente (tiempo que transcurre desde la picadura del mosquito infectado hasta la detección directa del parásito en sangre), algunos merozoítos, en vez de seguir el ciclo de reproducción esquizogónico, aumentan de tamaño sin que haya división del núcleo, convirtiéndose finalmente en gametocitos masculinos y femeninos (micro y macrogametocitos), estadio infectante para el mosquito *Anopheles* hembra.

**Ciclo sexuado o esporogónico → En el mosquito *Anopheles* hembra (Ciclo extrínseco)**

Después de ser succionados por el mosquito, los gametocitos llegan al intestino medio del vector, y se transforman en gametos sexualmente maduros. En la luz intestinal del mosquito, los macro y microgametos se conjugan formando el cigoto. Éste se vuelve móvil (ooquinetos) y se traslada a la pared del tubo digestivo del mosquito, donde se enquistan, conformándose el ooquiste. En el interior del ooquiste se originan miles de esporozoítos, mediante el proceso de multiplicación llamado esporogonia. Una vez maduro el ooquiste, se rompe y libera los esporozoítos, los cuales se dirigen a las glándulas salivales del artrópodo para ser inoculados nuevamente a una persona en la siguiente picadura. El tiempo necesario para que se complete el ciclo sexuado (periodo de incubación extrínseco) fluctúa entre 10 a 21 días, dependiendo de la especie de *Plasmodium* y de la temperatura promedio del ambiente.

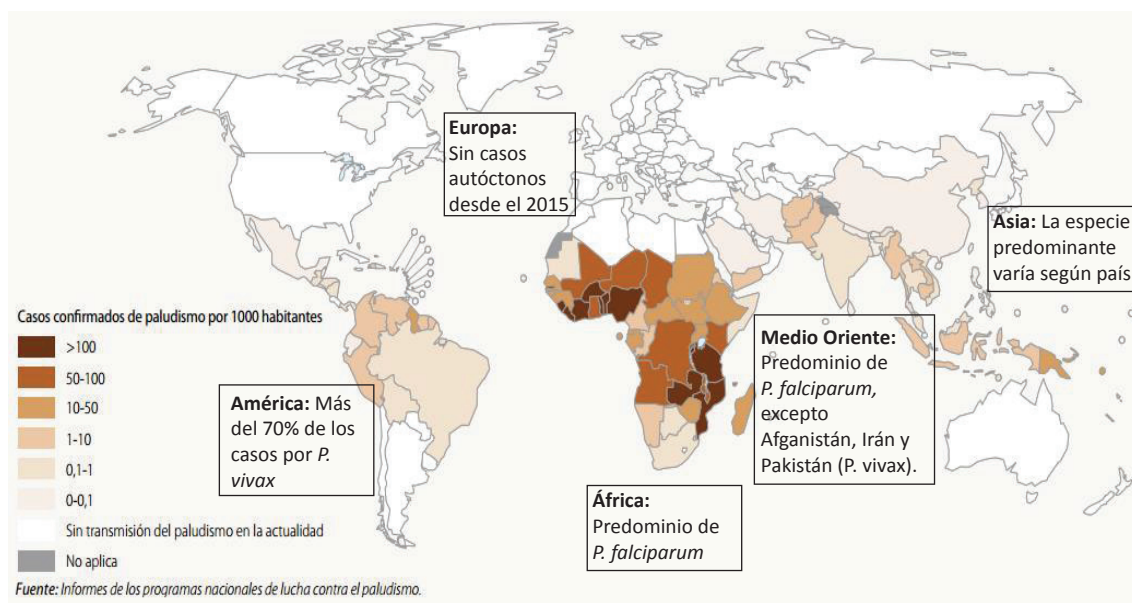
TABLA 2: Características del ciclo biológico según la especie				
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>
<b>Periodo prepatente</b>	9-10 días	11-13 días	10-14 días	15-16 días
<b>Duración del ciclo preeritrocítico</b>	5-6 días	7-8 días	9 días	13-16 días
<b>Ciclo esquizogónico eritrocítico</b>	48 horas	42-44 horas	50 horas	72 horas
<b>Gametocinemia</b>	8-11 días del periodo de patencia	Al 5to día de patencia	Al 6to día de patencia	10-14 días del periodo patente
<b>Recaídas</b>	No existen	Si	Si	No existen



## I.6. EPIDEMIOLOGÍA

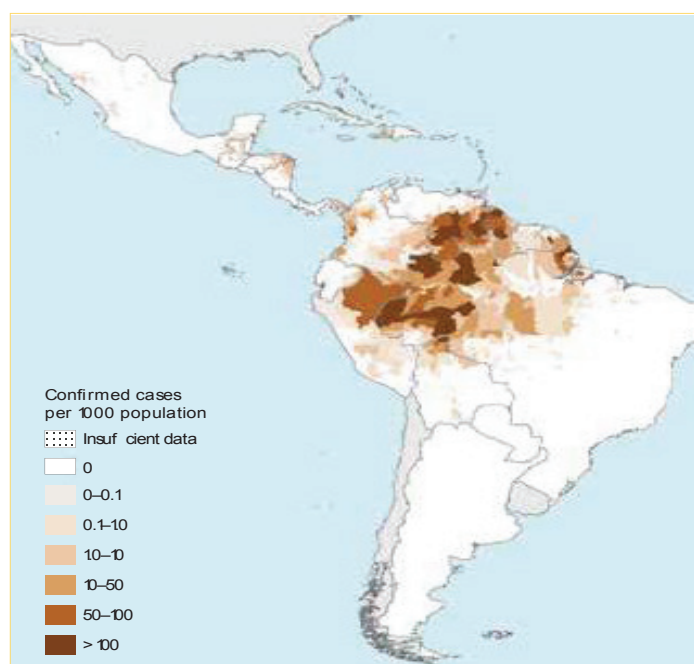
Según datos de la OMS, cerca de 3200 millones de personas, casi la mitad de la población mundial, corren el riesgo de contraer la enfermedad. En el 2015, el número de casos de malaria registrados en el mundo fue de 214 millones, y cerca de 438.000 muertes, de las cuales se estima que el 88% de estos casos y el 90% de todas las muertes son atribuidos a la región africana, seguido por la región sudeste de Asia, con el 10 % de los casos, y por último, el medio oriente, con el 2% (FIGURA 3).

**FIGURA 3:** Distribución de los casos de malaria en el mundo. Año 2013.



### Situación de malaria en las Américas

**FIGURA 4:** Casos de malaria confirmados por cada 1000 habitantes.



Se estima que cerca de 21 países del continente americano presentan transmisión activa de la enfermedad (World Malaria Report, OMS 2015), siendo *P. vivax* la especie causante de más del 70% de los casos registrados en la región, a excepción de ciertos países donde la especie predominante es *P. falciparum*, como Guyana Francesa, donde es responsable de más del 50% de los casos, y en República Dominicana y Haití, prácticamente el 100% de los casos. (FIGURA 4)

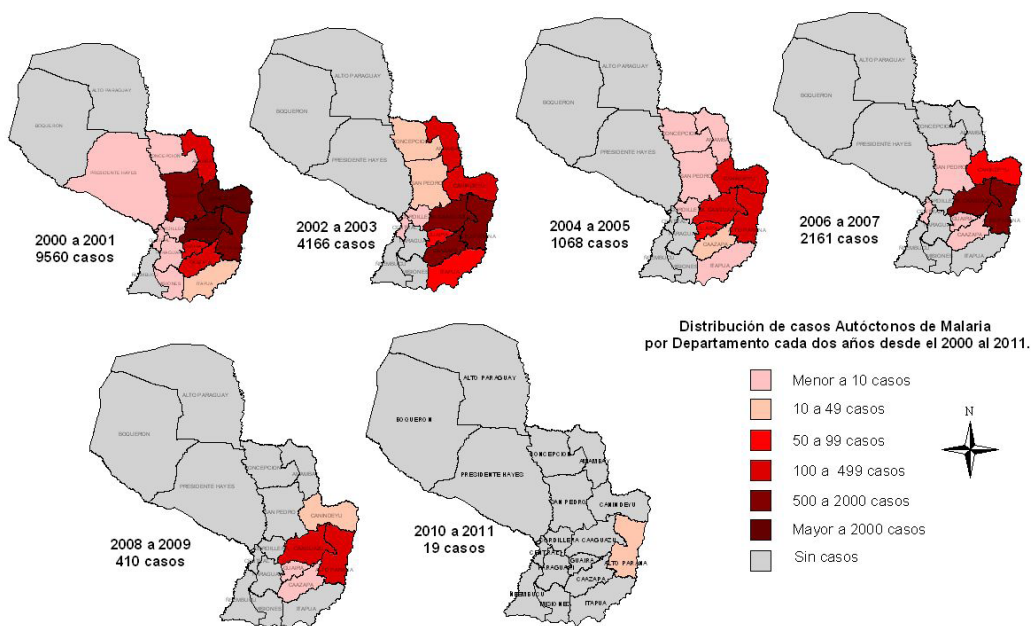
La mayor proporción de casos se notificaron en tres países: Brasil, Venezuela y Colombia y cerca del 50% de todas las muertes fueron registradas en Brasil.

Argentina, Costa Rica y Paraguay son los países que no reportan casos de transmisión autóctona por 3 o más años.

### Situación de la malaria en el Paraguay

La malaria era considerada como la enfermedad de transmisión vectorial más importante en la década de los años 1960, endémica en el 90% del territorio nacional, con epidemias cada 5 a 7 años hasta el año 2000 (FIGURA 5).

**FIGURA 5:** Distribución de casos autóctonos de malaria desde el 2000 al 2011 en el Paraguay.



Fuente: SENEPA

El principal agente etiológico en nuestro país fue *P. vivax*, sin casos autóctonos de *P. falciparum* desde 1996.

Mediante campañas de control realizadas por el SENEPA, la incidencia fue disminuyendo y las zonas de riesgo quedaron limitadas a los departamentos de Caaguazú y Alto Paraná, hasta que, en el año 2011, solamente fue detectado un 1 caso autóctono, posicionando actualmente a Paraguay entre los países con posibilidad de certificación como país libre de malaria.

En los últimos años se registraron casos importados de malaria al Paraguay principalmente de regiones de África, como Guinea Ecuatorial y Angola, además de casos de personas que provenían del Perú, Brasil y Haití, entre otros.



## I.7. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE MALARIA EN EL PAÍS

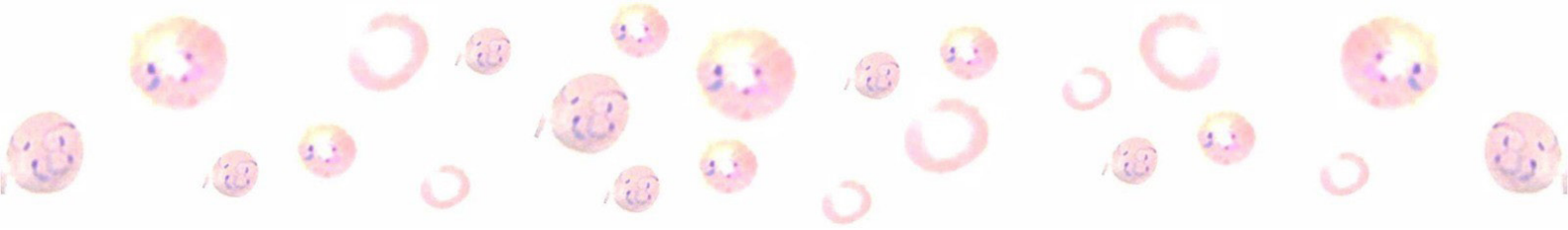
La malaria constituye una Enfermedad de Notificación Obligatoria (ENO), lo cual implica que todos los casos, ya sean sospechosos o confirmados, deben ser notificados de forma inmediata a la Dirección General de Vigilancia Epidemiológica (DGVS), a través del Centro Nacional de Enlace, y además debe ser reportado al SENEPA, a fin de aplicar las medidas de control necesarias con la mayor rapidez posible.

El objetivo principal de la vigilancia epidemiológica en nuestro país es la detección temprana de casos, mediante actividades basadas en la búsqueda activa y pasiva de los mismos.

- **Búsqueda activa:** Este tipo de vigilancia se realiza dependiendo del escenario que se presente:
  - Búsqueda activa del contingente de origen (BACO): Se realiza ante un caso confirmado de malaria importado, a través de la búsqueda de febriles entre los compañeros de viaje del caso índice, con el objetivo de detectar otros casos sospechosos.
  - Búsqueda activa comunitaria (BAC): Se realiza en toda área donde haya pernoctado el caso índice, con el objetivo de detectar otros casos relacionados.
  - Búsqueda activa institucional (BAI): Esta búsqueda será realizada cuando exista una sospecha de transmisión autóctona.
  - Vigilancia intensificada en servicios de salud (VISS): Se realiza ante la confirmación de todo caso sospechoso, mediante el fortalecimiento de la vigilancia pasiva, a fin de identificar sospechosos provenientes del área en estudio.
- **Búsqueda pasiva:** Consiste en la detección de casos sospechosos de malaria cuando la persona acude por cuenta propia al servicio de salud o a un trabajador comunitario de salud para realizar una consulta ante algún proceso febril. Se define caso sospechoso de malaria a una persona procedente de países con áreas endémicas, que presenta fiebre dentro de los 30 días de arribado a territorio nacional.

### *Definiciones operacionales*

- **Paciente asintomático:** Persona infectada con el parásito, que no presenta síntomas. Estos pacientes presentan gran importancia en la transmisión de la enfermedad.
- **Caso autóctono:** Caso confirmado que ha sido adquirido por transmisión local comprobada.
- **Caso importado:** Caso confirmado de malaria cuya fuente de transmisión está fuera del país en el que se hace el diagnóstico. Se debe comprobar que el origen de la infección se sitúa con certeza en otra zona palúdica conocida.
- **Caso inducido:** Es un caso confirmado en el que se demuestre que el parásito fue adquirido a través de una inoculación directa, por transfusiones sanguíneas, durante el parto o por agujas contaminadas.
- **Caso introducido:** Caso confirmado, secundario a un caso importado conocido, donde se pueda probar que éste constituye el primer eslabón de transmisión local.



- **Restablecimiento de la transmisión:** Presencia renovada de una incidencia medible de malaria adquirida localmente y transmitida por mosquitos en un área en la que se había interrumpido la transmisión.
- **Reinfección:** Consiste en una segunda infección por *Plasmodium* spp., que sobreviene a una infección anterior que ha sido completamente eliminada mediante un tratamiento eficaz.
- **Recaídas:** Consiste en un restablecimiento de la parasitemia, a partir de los hipnozoitos, formas latentes de *P. vivax* y *P. ovale* en el hígado, lo cual puede ocurrir tras un periodo de tiempo que va desde 2 meses hasta 1 año o más, posterior a la infección inicial. Los síntomas en las recaídas pueden ser leves o incluso estar ausentes.
- **Recrudescencia:** Es el caso originado por el restablecimiento del ciclo eritrocítico en infecciones producidas por *P. falciparum* o *P. malariae*, es decir cuando, tras un periodo de baja densidad, los parásitos alcanzan un número suficiente para provocar nuevos síntomas y signos clínicos.

## I.8. DIAGNÓSTICO CLÍNICO EPIDEMIOLÓGICO

Las manifestaciones iniciales de esta enfermedad no son muy específicas, no existe una combinación de signos y síntomas que sea característica y pueda diferenciarla de otras causas de fiebre, por lo tanto, pueden ser confundidas por otras patologías.

En nuestro país, donde la incidencia de casos de malaria es muy baja y se encuentra limitada a casos importados, se deben identificar no sólo los criterios clínicos, sino también los epidemiológicos, detectando pacientes con antecedentes de viajes a zonas donde haya podido estar expuesto a la enfermedad, acompañado de los síntomas ya mencionados como fiebre o antecedente de fiebre, sin otra causa aparente.

## I.9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Como ocurre en todas las patologías infecciosas, el diagnóstico confiable y temprano de la malaria es indispensable para el correcto manejo clínico del paciente y la administración de un tratamiento eficaz y oportuno. El retraso en el inicio del tratamiento se relaciona con la complicación del paciente hacia una malaria severa e incluso letal.

Las técnicas de rutina disponibles para el diagnóstico de esta patología son el examen de la gota gruesa y el frotis delgado, y las pruebas de diagnóstico rápido, capaces de otorgar un resultado al poco tiempo de haberse realizado la toma de muestra. Existen otras técnicas de diagnóstico como las técnicas inmunológicas y de biología molecular, pero estas no son utilizadas de forma rutinaria ni se encuentran disponibles en todos los laboratorios.

1. **Gota gruesa y frotis delgado:** El diagnóstico de la enfermedad fue realizado por primera vez alrededor del año 1880, mediante la observación microscópica del parásito en sangre por Alphonse Laveran. La técnica fue perfeccionándose en los años siguientes, con la modificación de los colorantes utilizados, hasta llegar al colorante de Giemsa, en 1904.

La detección del *Plasmodium* en sangre periférica por este método es considerado, hasta hoy día, **el estándar de oro en el diagnóstico de la malaria.**

Esta técnica puede ser realizada a partir de sangre capilar o sangre total con EDTA, y permite conocer la especie de *Plasmodium* infectante y la densidad parasitaria, con una alta sensibilidad (4 a 20 parásitos por microlitro), la cual la otorga el examen de gota gruesa, y especificidad, con el frotis delgado.

- 2. Pruebas de diagnóstico rápido (PDR):** Además de la microscopía, la segunda técnica de diagnóstico más difundida en el mundo, es la detección inmunocromatográfica por las tiras rápidas o pruebas de diagnóstico rápido, las cuales demostraron ser de gran utilidad en regiones de África, donde no es posible instalarse o mantenerse una microscopía de calidad, y la gran incidencia y mortalidad urge un diagnóstico y tratamiento rápido, además de evitar que se administre un tratamiento costoso a un paciente que no presente la enfermedad.
- 3. Técnicas inmunológicas:** Existen métodos inmunológicos disponibles para el diagnóstico de la malaria, como inmunofluorescencia, radioinmunoensayo, hemaglutinación y ELISA, pero éstas no reemplazan a la microscopía y no se utilizan de forma rutinaria, sino principalmente para estudios epidemiológicos de investigación.
- 4. Biología molecular:** La técnica más específica y sensible para la detección del parásito es por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), la cual consiste en la amplificación y detección de fragmentos conocidos de ADN, específicos del *Plasmodium*, según la secuencia del primer utilizado. El uso de esta técnica se limita a casos de sospecha de infecciones subclínicas y submicroscópicas, para confirmación de la especie infectante, y detección de genes asociados a la resistencia a drogas antimaláricas.

### **Pruebas de laboratorio complementarias**

Además del análisis de la gota gruesa, existen otros exámenes de laboratorio útiles para el manejo clínico del caso y para determinar la severidad de la infección, evidenciando, por ejemplo, la presencia de compromiso renal, falla hepática, acidosis metabólica, entre otros (TABLA 3).

<b>Prueba</b>	<b>Para detectar:</b>
<b>Hemograma</b>	Señales de anemia, leucopenia o trombocitopenia.
<b>Perfil hepático</b>	Evidenciar disfunción hepática.
<b>Electrolitos</b>	Hiponatremia, por la oliguria y el reemplazo inadecuado de líquidos y el incremento en la secreción de hormona antidiurética.
<b>Análisis de orina</b>	Hemoglobinuria, producida por la ruptura de hematies.
<b>Perfil renal</b>	Falla renal aguda, por necrosis tubular aguda, nefritis intersticial y glomerulonefritis.
<b>pH y gases arteriales</b>	Acidosis láctica y hipoxia.
<b>Glicemia</b>	Hipoglicemia, en niños debidos a gluconeogénesis hepática alterada o mayor consumo de glucosa por órganos periféricos y en adultos por hiperinsulinemia.

## I.10. TRATAMIENTO

El tratamiento de la malaria debe iniciarse tan pronto se obtenga la confirmación parasitológica por el laboratorio. La elección del tratamiento se realiza según la especie infectante, la densidad parasitaria, la tolerancia del paciente a la droga por vía oral, la presencia de condiciones como embarazo o inmunocompromiso, y además varía si se trata de un caso de malaria complicada o no complicada.

Para el tratamiento se recomienda usar una terapia basada en la combinación de Artemisina o sus derivados, que es una droga de acción rápida contra los parásitos circulantes en sangre y estadios sexuales, con una segunda droga de larga duración y diferente modo de acción. La droga con actividad prolongada elimina los parásitos restantes y sirve de protección contra la aparición de resistencia al derivado de Artemisina (TABLA 4). Es importante tener en cuenta que cada país dispone de un esquema de tratamiento de primera línea, en base a la presencia de resistencias en la región.

TABLA 4: Esquema de Tratamiento	
<b>Malaria no complicada por <i>P. falciparum</i></b>	
Para niños y adultos (a excepción de mujeres embarazadas en el primer trimestre)	Tratamiento combinado con Artemisina o sus derivados (TCA) con una dosis única de primaquina.
Embarazadas en el primer trimestre	Quinina + Clindamicina
<b>Malaria severa por <i>P. falciparum</i></b>	
Para niños y adultos (a excepción de mujeres embarazadas en el primer trimestre)	Artesunato intravenoso o intramuscular
<b>Malaria por <i>P. vivax</i>, <i>P. ovale</i>, <i>P. malariae</i> o <i>P. knowlesi</i></b>	
Para niños y adultos (a excepción de mujeres embarazadas en el primer trimestre)	Cloroquina (en zonas sin resistencia a esta droga). Para infecciones por <i>P. vivax</i> y <i>P. ovale</i> combinar el tratamiento con Primaquina para evitar recaídas.
Embarazadas en el primer trimestre	Cloroquina

Las fallas en el tratamiento se confirman por microscopía, y pueden deberse a:

- Resistencia a las drogas antimaláricas: Se ha registrado resistencia en *P. falciparum* a casi todas las drogas utilizadas actualmente (amodiaquina, cloroquina, mefloquina, quinina y sulfadoxina-pirimetamina), y en *P. vivax*, resistencias a sulfadoxina-pirimetamina y a cloroquina en ciertas zonas. En la actualidad, la resistencia a la cloroquina por *P. falciparum* se encuentra ampliamente distribuida en casi toda la región africana, amazónica y en la costa del Pacífico de Sudamérica, con casos de resistencia a la artemisinina reportados en Camboya, Tailandia, Myanmar y Vietnam. La resistencia de *P. vivax* a la cloroquina fue confirmada en Brasil, Etiopía, Indonesia, Malasia, Myanmar, Tailandia, Papúa Nueva Guinea y Perú.
- Exposición inadecuada al fármaco, debido a una dosificación inadecuada, baja adherencia, vómitos, interacciones con otros fármacos, drogas de mala calidad, entre otros.



## CAPÍTULO 2: PREPARACIÓN DE LA GOTA GRUESA Y EL FROTIS DELGADO

Para el diagnóstico de la malaria se recomienda la realización conjunta de dos tipos de frotis de sangre periférica del paciente sospechoso: la gota gruesa (o frotis grueso) y el frotis delgado (o extendido fino). Los frotis delgados preparados correctamente son más gruesos al inicio y más delgados al final, en donde debe poseer una sola capa de células. Los frotis delgados son especialmente útiles para determinar las características morfológicas de los parásitos, pero debido a la pequeña cantidad de sangre que se usa para la preparación, no son tan sensibles. **La gota gruesa permiten examinar un mayor volumen de sangre y por lo tanto es entre 20 a 30 veces más sensibles que el frotis delgado.**

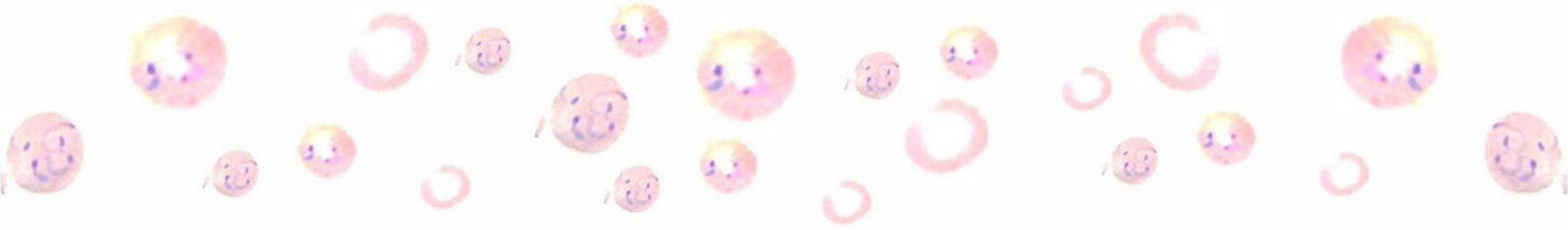
El **pedido de gota gruesa para el diagnóstico de malaria** implica la realización del frotis delgado de forma simultánea, ya sea en una misma lámina o en láminas separadas.

### ***Muestra requerida***

Cualquier tipo de muestra obtenida de sangre periférica (capilar, venosa o arterial) puede ser utilizada para la confección de los frotis para el diagnóstico de la malaria, no obstante suele preferirse la sangre capilar obtenida por punción del dedo, por ser la más práctica para el diagnóstico de los casos sospechosos de malaria.

Es posible utilizar también sangre anticoagulada con el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, en su presentación di o tri potásica) para la realización de los frotis para el diagnóstico de la malaria. De ser así, debe tenerse en cuenta que la sangre anticoagulada puede distorsionar levemente los elementos sanguíneos y por lo tanto también los parásitos, la adherencia de la sangre al vidrio del portaobjetos es menor en el caso de sangre anticoagulada con EDTA y debe secarse por un periodo de tiempo más prologado para que la coloración salga adecuadamente. Debe cuidarse al máximo que la sangre anticoagulada sea refrigerada a 4 °C inmediatamente después de su extracción, para frenar el desarrollo y la destrucción de los parásitos. Si esta muestra es correctamente refrigerada puede ser procesada hasta dentro de las 2 horas para la confección de los frotis para diagnóstico de la malaria. No se recomienda la utilización de ningún otro tipo de anticoagulante.

La toma de muestra para diagnóstico de la malaria puede realizarse en cualquier momento del día. Sin embargo, el momento ideal para la toma de muestra es durante el pico febril del paciente, puesto a que éste es provocado por la rotura de los glóbulos rojos con liberación de los parásitos al torrente sanguíneo. Esto adquiere mayor importancia en casos de infección por *P. falciparum*, ya que normalmente los hematíes parasitados se encuentran atrapados en los capilares y tienen una muy baja circulación por sangre.



## 2.1. NORMAS BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD

Las buenas prácticas de bioseguridad deben ser implementadas durante todos los procedimientos realizados, y son fundamentales en la prevención de exposición a microorganismos infecto-contagiosos.

Antes de la toma de muestra se debe contar con lo siguiente:

- La ficha del paciente, que indique su procedencia, además de otras condiciones preexistentes como inmunocompromiso.
- Equipo de Protección Individual (EPI): guantes, guardapolvos.
- Contenedores adecuados para los residuos, según sean:
  - Materiales cortopunzantes: Contenedor rígido, resistente al corte y la punción.
  - Torundas, guantes y gasas: Bolsas blancas con el signo de riesgo biológico.
  - Papeles no contaminados: Bolsas negras.
- Desinfectantes: Se utiliza hipoclorito de sodio al 0,5% para las superficies de trabajo e hipoclorito de sodio al 1% para su uso en caso de derrames.

***Durante todo el procedimiento se deben seguir las Normas básicas de Bioseguridad.***  
Todas las muestras deberán ser tratadas como altamente infecciosas.

## 2.2. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA DE SANGRE

### ***Insumos para la obtención de la muestra por punción capilar***

- Lanceta estéril descartable.
- Algodón.
- Alcohol etílico al 70%.
- Guantes de látex descartables.
- Laminas portaobjetos de bordes esmerilados, nuevas y limpias (Ver Anexo I)
- Lápiz de papel (con minas de grafito).
- Ficha epidemiológica: Ficha de síndrome febril agudo (SFA), u otra suministrada para tal uso.
- Ficha de registro del laboratorio (Lab1)
- Recipiente para el desecho de materiales corto-punzantes (aguja, lancetas)
- Bolsa roja para el desecho de algodones, guantes de látex y otros elementos utilizados y contaminados con sangre.
- Solución de hipoclorito de Sodio al 0,5% y al 1%.





### ***Insumos para la obtención de la muestra por punción venosa***

Además de los insumos utilizados para la obtención de muestra por punción capilar, se deben tener los siguientes elementos:

- Goma para ligar el brazo.
- Jeringa.
- Tubo con EDTA.

La técnica de extracción de la muestra de sangre venosa con el anticoagulante EDTA se realiza siguiendo los procedimientos estandarizados en cada institución, o siguiendo los pasos detallados en el ANEXO III.

### ***Procedimiento para la obtención de la muestra por sangre capilar***

Es necesario que en el momento de toma de muestra se cuente con la ficha epidemiológica de malaria (Ficha de síndrome febril agudo u otra diseñada para tal uso) completada en su totalidad y de forma correcta por el médico (la cual debe ser proveída por el paciente) o de lo contrario debe ser completada por el personal de toma de muestra.

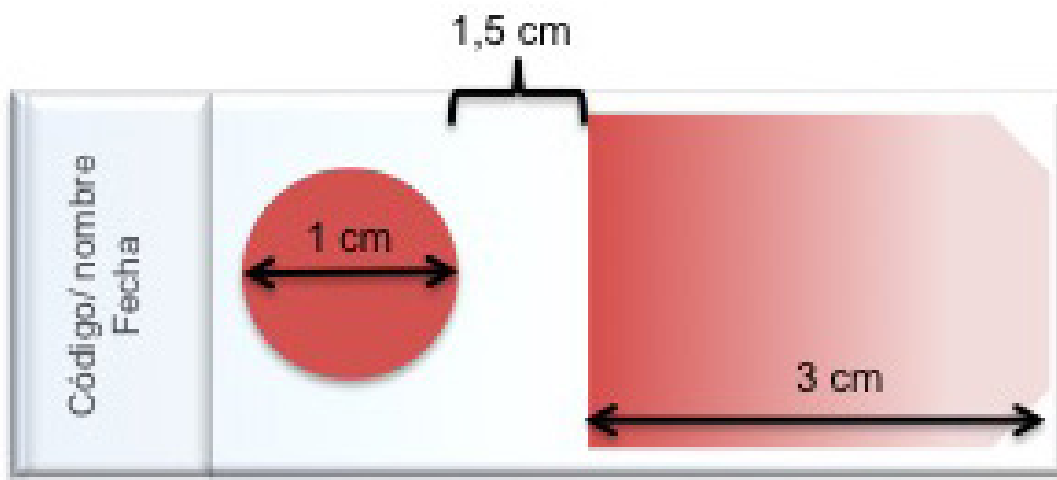
La sangre obtenida por punción capilar puede ser obtenida de cualquier parte del cuerpo, sin embargo se prefiere la obtenida por puntura de la yema del dedo anular o medio de la mano (en recién nacidos o lactantes se puede utilizar el talón o el lóbulo de la oreja).

1. Verificar los datos de la ficha epidemiológica y rotular la lámina en el extremo esmerilado, indicando la fecha y el código o nombre del paciente.
2. Preparar el área de extracción con los materiales necesarios.
3. Seleccionar el dedo del paciente, luego frotar la yema del dedo vigorosamente para estimular la circulación sanguínea.
4. Limpiar vigorosamente la zona de punción, con una torunda de algodón embebida en alcohol al 70%, para eliminar la suciedad o grasa que pueda tener la piel. Esperar unos segundos hasta que se evapore completamente el alcohol.
5. Realizar la punción en el borde de la yema del dedo con la lanceta, mediante un movimiento de rotación rápido. La punción debe tener una profundidad aproximada de 3 a 4 mm. Utilizar una nueva lanceta para cada paciente, NO reutilizar.
6. Si se realizó una buena punción, la sangre debe fluir espontáneamente. Limpiar la primera gota con un algodón seco, evitando que queden hebras del algodón.
7. Recoger rápidamente la sangre, que vuelve a fluir de la punción, en una lámina portaobjetos, sosteniéndola por los bordes o cantos: Se necesitan dos gotas, una gota de tamaño similar a una cabeza de fosforo (o tres gotas pequeñas), colocada en el primer tercio de la lámina, para la gota gruesa, y otra más pequeña para el frotis delgado en el centro de la lámina. También es posible realizar el frotis y la gota gruesa en láminas individuales. El flujo sanguíneo insuficiente puede ser mejorado mediante la presión o masaje suave a los lados de la yema del dedo. Evite presionar el dedo en exceso, ya que podría contaminar la muestra con líquido tisular.

8. Limpiar la sangre restante del dedo con una torunda de algodón con alcohol, indicando al paciente que presione por 5 minutos.
9. Realizar rápidamente, antes que la sangre coagule y se seque, la gota gruesa y el frotis, de la siguiente manera:
  - a. **Frotis delgado:** Poner en contacto el borde de la lámina auxiliar (utilizada como extensor) con la gota de sangre más pequeña, permitiendo que la sangre se extienda a lo largo del mismo, y deslizarla firmemente por la superficie de la lámina manteniendo un ángulo de 45°, cuidando de que se mantenga un contacto uniforme en todo momento.
  - b. **Gota gruesa:** Utilizando la esquina del extensor, realizar varios movimientos rotatorios concéntricos (durante 20 o 30 segundos), en una misma dirección (de adentro para afuera o viceversa) extendiendo la gota de sangre colocada en el primer tercio, hasta que tenga un diámetro de 1 cm aproximadamente (FIGURA 6). Este procedimiento es realizado para desfibrinar la sangre.

La lámina extensora utilizada puede ser utilizada para el siguiente paciente, y una nueva lámina limpia será utilizada como extensor.

**FIGURA 6:** Patrón a utilizar para la preparación de las láminas.



10. Dejar la lámina en una superficie plana, diferente a la mesada de trabajo, hasta que la sangre se encuentre completamente seca. Cubrir las láminas confeccionadas durante el proceso de secado para evitar la contaminación con polvo y la acción de insectos sobre los frotis. Para acelerar el secado se puede utilizar calor suave, como el calor generado por un foco incandescente o una estufa a 37 °C. Demasiado calor, puede producir la autofijación de la gota gruesa e interferir así en la deshemoglobinización.
11. Una vez que el frotis se encuentre completamente seco, colocar la lámina en el portálaminas.

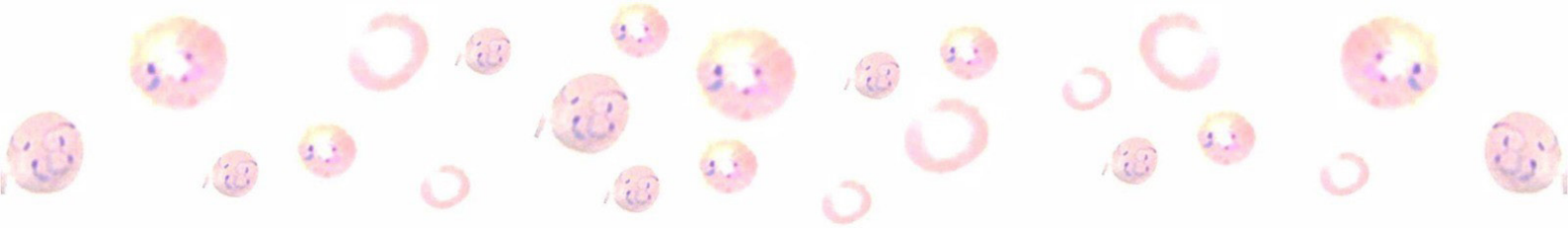
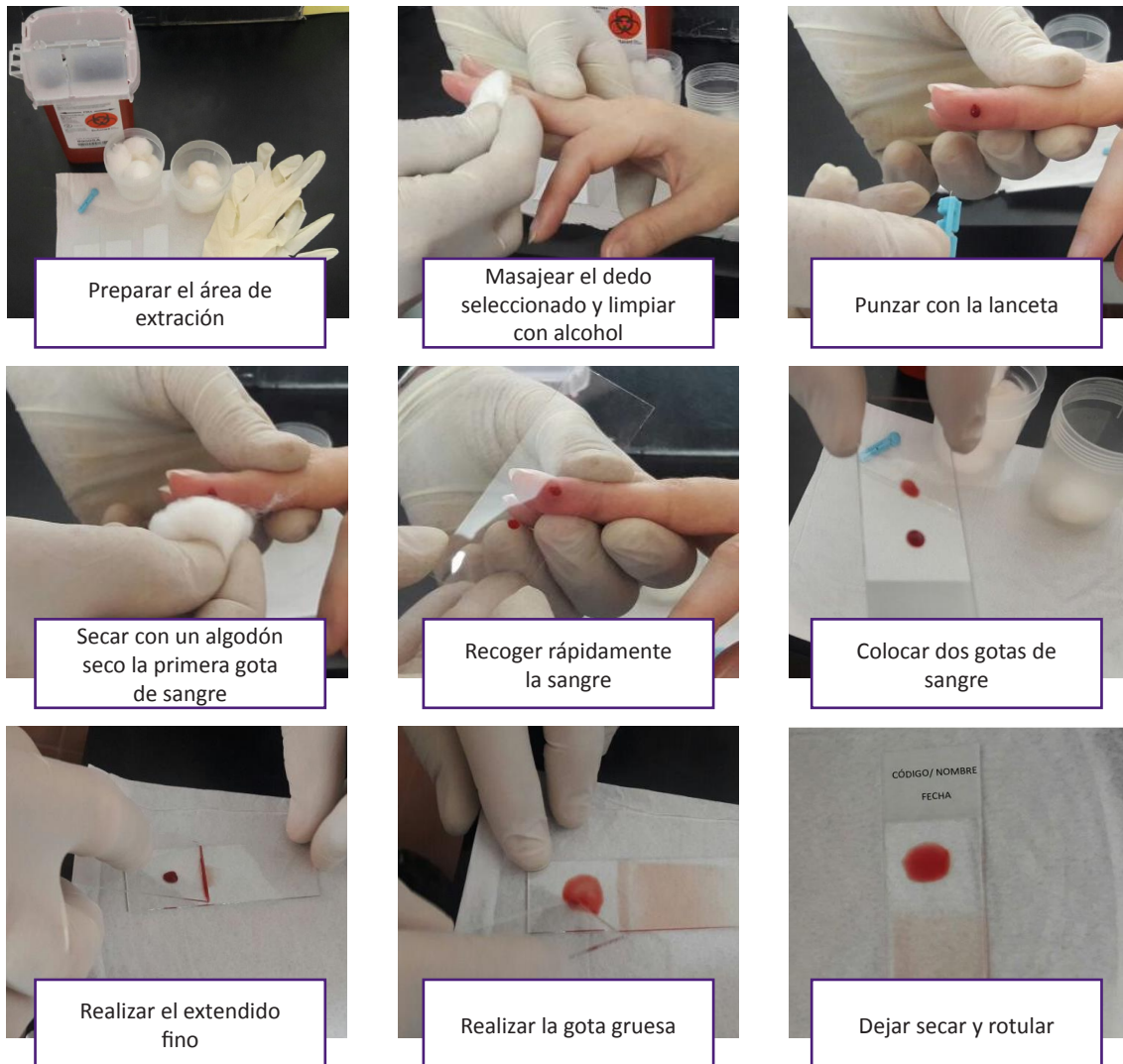
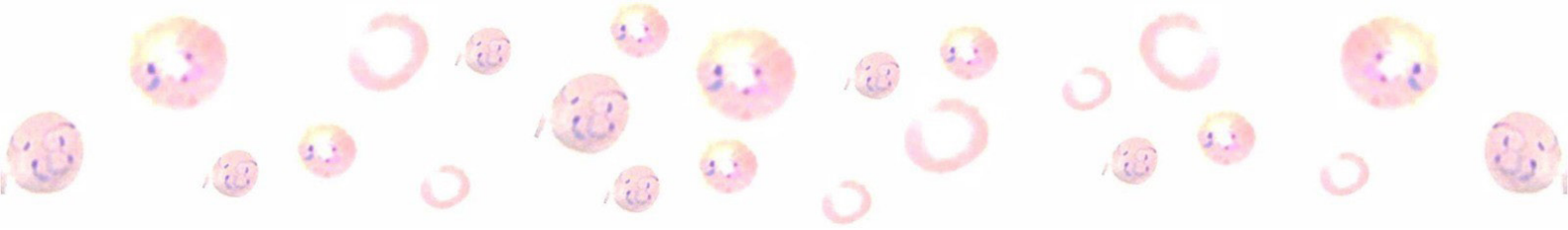


FIGURA 7: Esquema de trabajo.



### 2.3. CUIDADOS Y RECOMENDACIONES

- Utilizar correctamente el equipo de protección individual.
- Las láminas a ser utilizadas deben ser nuevas preferentemente y limpias, siguiendo el proceso detallado en el Anexo I. Aunque sean láminas nuevas, estas pueden presentar polvo, hongos o grasa, que pueden afectar a la preparación de la gota gruesa y el frotis delgado, y dificultar su observación microscópica
- Si no se disponen de láminas nuevas, se debe corroborar que las mismas no presenten rajaduras, superficie irregular o estén opacas.
- Sostener la lámina por los cantos para evitar llenarlas de grasa.
- Utilizar láminas con la banda esmerilada, para etiquetar mejor el código y nombre del paciente.
- Realizar mínimo tres láminas por paciente.



## 2.4. ERRORES FRECUENTES EN LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- **Muestra de sangre mal posicionada:** Cuando se realiza el frotis delgado y la gota gruesa en una misma lámina, es importante que estas estén separadas por 1 cm como mínimo, para evitar problemas en el momento de la fijación del frotis.
- **Lámina con grasa:** La sangre se extiende de forma irregular y puede desprenderse durante el proceso de coloración.
- **Mucha cantidad de sangre:** Cuando existe una concentración excesiva de elementos celulares, la coloración queda con un fondo azulado (muy básico) y no puede visualizarse correctamente los parásitos. El frotis queda muy grueso, con los glóbulos rojos apilados.
- **Poca cantidad de sangre:** No se dispone de elementos celulares suficientes para realizar un buen diagnóstico.
- **Lámina auxiliar extensora con superficie irregular:** El frotis delgado queda con una superficie irregular.
- **Secado incorrecto de la muestra:** Puede ocurrir cuando la lámina se encuentra en una superficie irregular, en un lugar con polvo o insectos, expuestas al calor y la humedad.

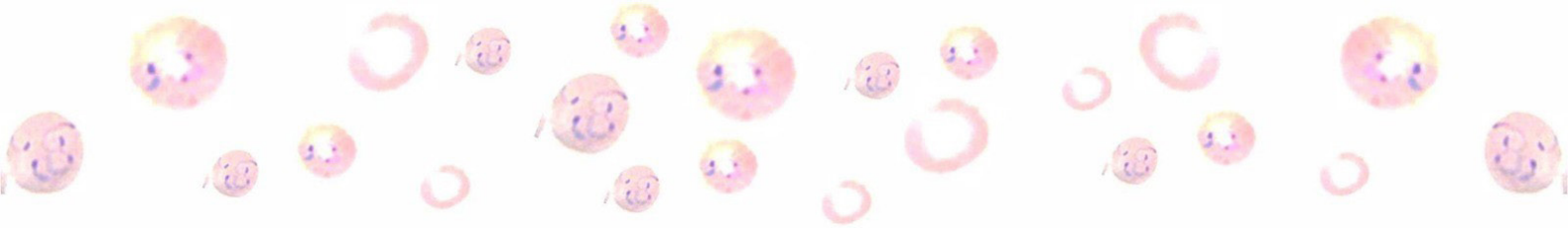
## 2.5. TRANSPORTE Y ENVÍO DE LAS MUESTRAS

Las muestras correctamente identificadas deben ser colocadas en un recipiente adecuado para su envío, con la ficha de laboratorio correspondiente, dependiendo si se envían láminas, papel de filtro o muestra de sangre con EDTA, con el objetivo de evitar roturas o derrames y, en caso de tubos con sangre, se debe enviar refrigerado.

**Para el envío de láminas,** se recomienda el uso de recipientes de cartón, madera o metal de paredes rígidas, a fin de evitar la rotura de las mismas. Las láminas deben estar separadas unas de otras con un papel suave, o utilizar lamineros si se disponen, y las fichas en un sobre o bolsa separado de las muestras y adherido al empaque anterior. Las láminas coloreadas deben estar libres de aceite de inmersión en el momento del envío, colocando las mismas sobre un papel absorbente, sin rasparlas. Si no están coloreadas, se debe esperar a que las mismas se sequen completamente antes de embalarlas. En climas cálidos y húmedos se puede producir la autofijación de la gota gruesa, por lo tanto se recomienda que la muestra sea coloreada y/o remitida lo antes posible.

**El envío del papel de filtro** debe realizarse en bolsas pequeñas herméticamente cerradas, y las fichas en un sobre o bolsa separada, adherido al empaque anterior.

**Para el envío de muestras de sangre con EDTA** (exclusivo para PDR y pruebas moleculares) se debe cumplir el sistema de triple embalaje: la muestra de sangre debe trasladarse en el interior de un tubo herméticamente cerrado y correctamente rotulado (recipiente primario), envuelto en papel absorbente. Los tubos con sangre son colocados en un envase hermético e imper-



meable (recipiente secundario), que encierra y protege a los recipientes primarios. El material refrigerante se coloca por fuera del recipiente secundario. Por último, el recipiente secundario debe ser contenido en un envase rígido y resistente, que proteja la muestra de daños físicos (recipiente terciario). La ficha debe enviarse dentro del contenedor terciario, en una bolsa o sobre, evitando que las mismas se mojen durante el transporte.





## CAPÍTULO 3: COLORACIÓN DE LAS MUESTRAS

### 3.1. TINCIÓN DE GIEMSA

Es una coloración tipo Romanowsky, formado por una combinación de colorantes básico, Azul de Metileno y sus derivados oxidados, y el colorante ácido Eosina. El colorante se encuentra disponible de forma comercial, o puede ser preparada a partir de sus componentes individuales (ANEXO II).

- Los colorantes básicos se unen a los componentes ácidos de las células: ácidos nucleicos, gránulos en basófilos y proteínas ácidas, que se tiñen de un color rojo púrpura, de intensidad variable.
- El colorante ácido, la Eosina, se une a la hemoglobina, a los componentes básicos celulares y los gránulos de los eosinófilos.

La gota gruesa y el frotis delgado se tiñen simultáneamente, con la diferencia que el frotis requiere una fijación previa con metanol y la gota gruesa no, lo cual permite la deshemoglobinización de los glóbulos rojos durante la tinción con Giemsa.

La deshemoglobinización de la gota gruesa consiste en la ruptura del glóbulo rojo y la disolución de su contenido, lo cual permite una mejor visualización de las muestras, eliminando la capa de glóbulos rojos, y dejando a los parásitos de forma libre, en un fondo claro.

#### ***Normas básicas de bioseguridad***

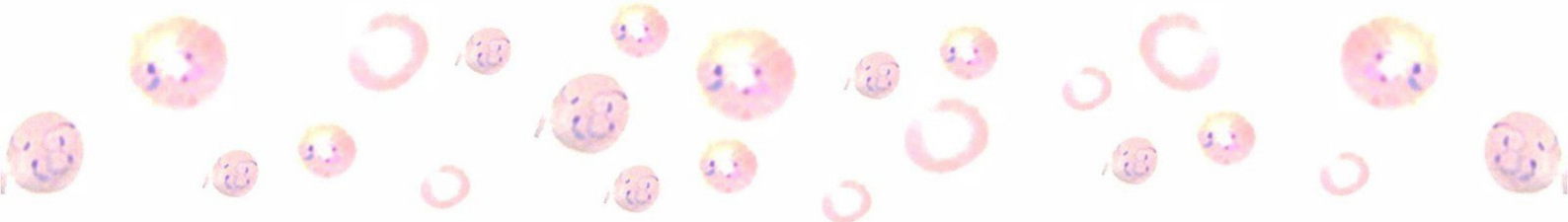
Realizar la coloración de las láminas en un área ventilada, utilizando el equipo de protección individual (guantes, guardapolvo).

#### ***Reactivos y materiales***

- Metanol absoluto (Fijador)
- Colorante Giemsa
- Buffer fosfato salino pH: 7,2 ( $\pm 0.5$ ) (Preparación en Anexo II)
- Agua
- Gradilla o soporte para coloración
- Tubo o frasco para preparar la solución de trabajo
- Cronómetro
- Pipeta Pasteur o recipiente para el Metanol

#### ***Preparación de la solución de trabajo***

Para la coloración se utiliza una concentración del colorante del 10%, el cual se prepara en el momento en el que será utilizado en un recipiente o tubo limpio y seco, de la siguiente forma:



- Se agregan dos gotas de solución madre de Giemsa por cada mililitro de solución amortiguadora o buffer, o 1 mL del colorante para 9 mL del buffer.
- Se calcula entre 2 a 3 mL de solución de trabajo por cada lámina.
- La solución de trabajo debe ser utilizada dentro de los 15 minutos posteriores a su preparación, y cualquier remanente debe ser descartado.

### 3.2. TÉCNICA DE COLORACIÓN DE LAS MUESTRAS

1. Para fijar el frotis delgado con metanol, colocar la lámina en posición vertical, con el frotis en el extremo inferior, y con ayuda de una pipeta Pasteur, verter unas gotas de metanol sobre el mismo o sumergirlo en un frasco con metanol durante 2 a 3 segundos, cuidando que el metanol no entre en contacto con la gota gruesa (si se prepararon ambas en una misma lámina), y dejar secar.
2. Colocar la lámina en la bandeja para coloración y agregar la solución de trabajo, cuidando que cubra completamente la lámina. Colorear por 10 a 20 minutos.
3. Eliminar el colorante y sumergir la lámina con cuidado en un recipiente con agua de grifo, para eliminar el remanente. No utilizar la corriente del grifo, porque la presión del agua puede arrastrar la muestra de la gota gruesa.
4. Dejar secar.

Cada laboratorio debe estandarizar la concentración del colorante y el tiempo de tinción, según el reactivo que disponga.

**FIGURA 8:** Esquema de trabajo



Preparar la solución de trabajo (Sol. de Giemsa al 10%)



Fijar el extendido fino con metanol. Dejar secar.



Colorear la lámina (10 a 20 min)



Eliminar el colorante remanente.



### 3.3. RECOMENDACIONES PARA UNA BUENA COLORACIÓN

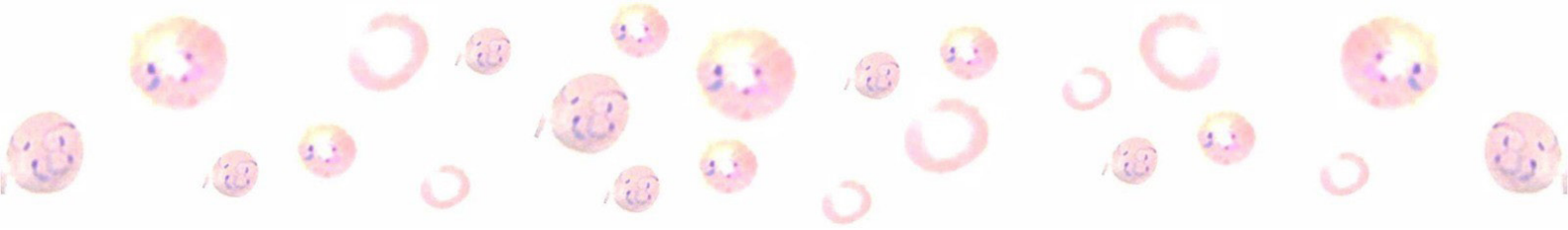
- Antes de realizar la coloración, asegurarse de que la muestra esté completamente seca.
- Se debe tener en cuenta algunos cuidados con relación a la manipulación y almacenamiento del colorante:
  - Fraccionar la solución madre en un frasco más pequeño, para evitar la contaminación del frasco principal.
  - No agregar agua o utilizar una pipeta mojada, ni devolver el colorante diluido, al recipiente original.
  - La solución madre del colorante Giemsa se debe almacenar en un lugar seco, en frasco oscuro, protegido de la luz solar directa, pues puede producir la volatilización del solvente y la oxidación del colorante.
  - No agitar el frasco del colorante antes de usarlo, para no suspender los precipitados que se depositan en el fondo del frasco, los cuales interfieren en la coloración y visualización posterior.

### 3.4. CONTROL DE CALIDAD DE LA COLORACIÓN

La calidad de la coloración se visualiza según la tonalidad de los componentes normales de la sangre y de los parásitos de *Plasmodium* sp. (TABLA 5).

TABLA 5: Coloración que adquieren los elementos celulares	
Tipo de Célula	Coloración con Giemsa
Linfocitos	Núcleo azul violeta Citoplasma azul
Monocitos	Núcleo azul violeta Citoplasma azul claro
Neutrófilos	Núcleo púrpura o azul oscuro Citoplasma rosa pálido Gránulos rosados a azul claro
Basófilos	Núcleo púrpura o azul oscuro Gránulos azul oscuro a negro
Eosinófilos	Núcleo azul Citoplasma rosa pálido Gránulos de color rosado característico
Plaquetas	Tono azulado
Eritrocitos	Gris pálido a rosa

El resultado de tinción puede verse afectado por diferentes factores como el valor del pH de la solución y de la solución tampón, el tiempo de tinción y la fijación (FIGURA 9).

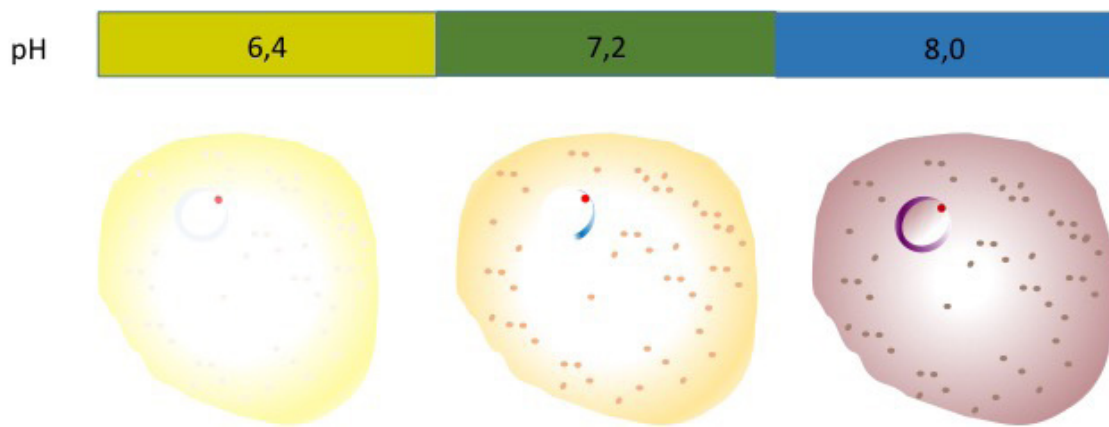


Una tinción demasiado azulada se puede deber a preparaciones muy gruesas, pH muy alcalino del buffer o de los diluyentes, o portaobjetos defectuosos.

Una tinción excesivamente rosada se debe a pH ácido de los productos, tiempos inadecuados en ambos colorantes o montaje antes de que la preparación esté completamente seca.

También podemos encontrar una tinción desigual en diferentes partes de la lámina producidas por el uso de láminas sucias, lavado desigual, colorantes distribuidos desigualmente, entre otros.

**FIGURA 9:** Variaciones en la tonalidad según el pH





## CAPÍTULO 4: OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LA MUESTRA

La examinación de muestras de sangre periférica permite el diagnóstico de infecciones ocasionadas por *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Babesia* y microfilarias, en base a sus características morfológicas y a la coloración diferencial de sus componentes, para lo cual se necesita que la lámina sea preparada y coloreada de forma adecuada, que el observador sea un microscopista capacitado y que se observe la cantidad de campos necesarios, a fin de otorgar un diagnóstico certero.

La observación e identificación de parásitos del género *Plasmodium* en sangre periférica constituye la metodología más exacta y económica para realizar el diagnóstico de la malaria, y se realiza mediante la observación por microscopía directa de dos tipos de películas: la gota gruesa y el frotis delgado.

### **Fundamento de la gota gruesa**

La gota gruesa está formada por varias capas de células sanguíneas, más densa que el frotis delgado. Esto produce una concentración de glóbulos rojos, los cuales son deshemoglobinizados, dejando los parásitos libres y facilitando así la detección de los parásitos de *Plasmodium*, incluso a bajas parasitemias.

### **Fundamento del frotis delgado**

El frotis delgado o extendido fino consiste en una única capa de células sanguíneas fijada con metanol, lo cual permite examinar mejor la morfología del parásito y del glóbulo rojo parasitado, especialmente útil para identificar la especie de *Plasmodium* causante de la infección.

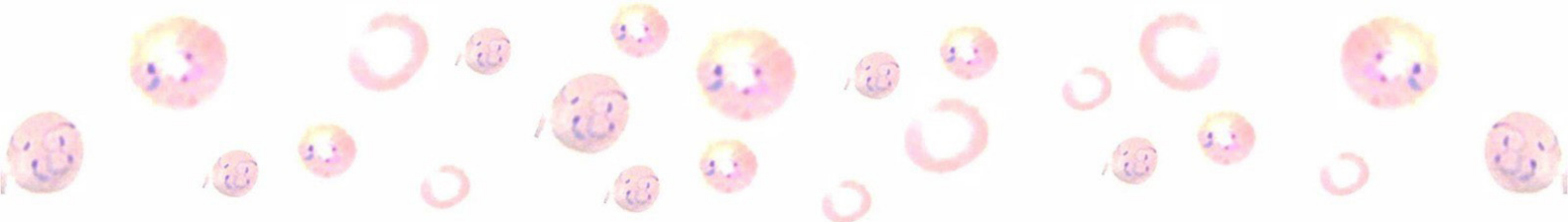
## 4.1. EXAMEN DE RUTINA DE LA GOTA GRUESA Y EL FROTIS

Para el diagnóstico de malaria se debe examinar la gota gruesa teñida con colorante Giemsa, y en casos que sean necesarios, el frotis delgado.

El frotis puede ser de gran utilidad, y se recomienda su examinación, cuando la gota gruesa es muy pequeña, se perdió durante la coloración o se autofijo, para confirmación de la especie, cuando no pueda ser realizada directamente de la gota gruesa, cuando existen sospechas de infección mixta y cuando la densidad parasitaria sea muy alta.

### **Exploración de la gota gruesa**

Utilizando el objetivo 10X, o 40X se recorre la gota gruesa y se elige la parte en la que se observe una buena tinción y en la que los glóbulos blancos se encuentren distribuidos uniformemente. Luego se selecciona el objetivo 100X con aceite de inmersión y se confirma la selección del campo, se calcula que es un campo aceptable cuando en él se encuentran 15 a 20 leucocitos. Si los campos presentan una menor cantidad, se deberá recorrer la muestra en mayor extensión.



Para informar una muestra como negativa es necesario que se examinen 500 campos en busca de parásitos, lo cual lleva su tiempo, y debe realizarse prestando la mayor atención posible.

Si la muestra examinada resulta positiva es importante tratar de recorrer la totalidad del frotis para determinar si la infección es producida por una sola especie o si es mixta. Para poder informar el resultado se debe determinar la especie (puede realizarse con ayuda del frotis delgado) y la densidad parasitaria de los estadios observados.

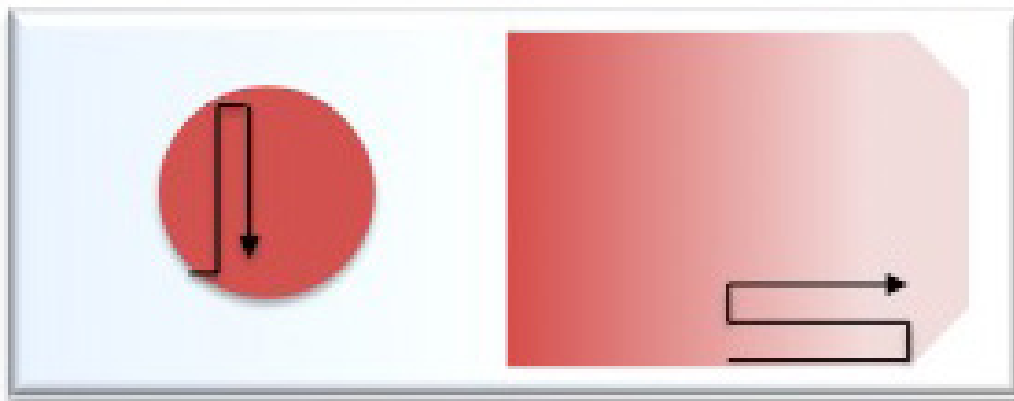
Al terminar la examinación de la muestra, elimine el aceite de inmersión remanente, apoyando la lámina por un papel suave por unos minutos, sin frotar la lámina, y luego almacenarla en una caja porta láminas.

### ***Exploración del frotis delgado***

La examinación del frotis delgado se debe realizar en la cola del frotis (extremo distal), donde se observe una distribución uniforme de las células y los eritrocitos no se encuentren muy distorsionados, siguiendo un movimiento de zigzag (FIGURA 10).

Dar un resultado negativo mediante la examinación del frotis precisa más tiempo que a partir de la gota gruesa, pues requiere de una observación de 800 campos como mínimo.

**FIGURA 10:** Método de exploración de las láminas



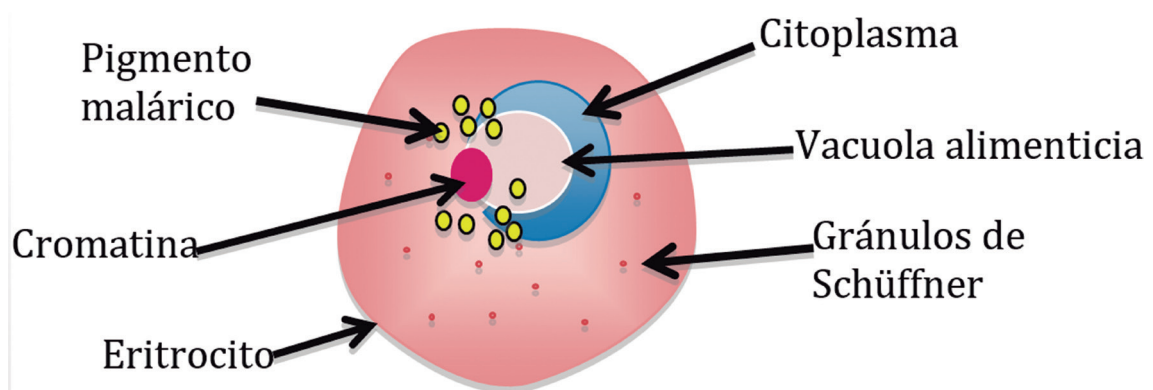
# CAPÍTULO 5: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Plasmodium*

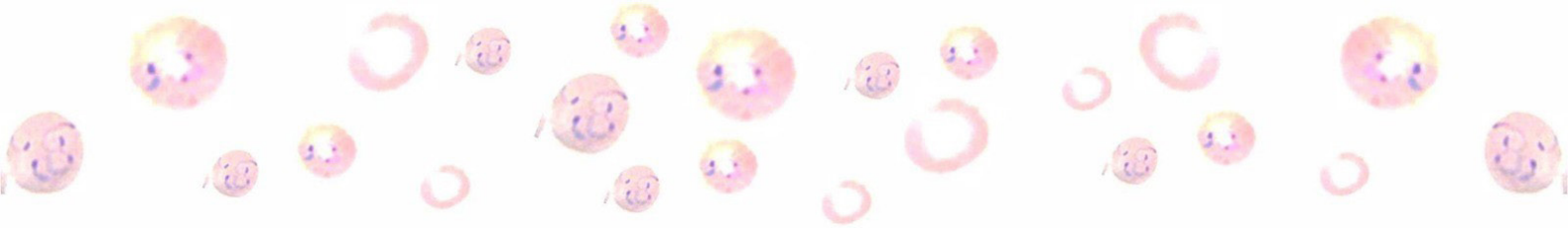
## 5.1. RECONOCIMIENTO DEL PARÁSITO

En la gota gruesa, los parásitos se observan en forma libre, sin embargo, en el frotis delgado, los parásitos se observan dentro de los eritrocitos, cuya morfología y tamaño pueden verse afectados según la especie de parásito infectante.

Los parásitos se observan con una **cromatina** redonda, de color rojizo (rojo grosella), el **citoplasma** adquiere diferentes formas, dependiendo del estadio y del parásito, pudiendo tener forma de anillo, redondeada, con forma de banana o completamente irregular, adquiriendo una coloración azulada, cuya intensidad varía entre diferentes especies del parásito. Además, es posible visualizar el **pigmento malárico característico o hemozoína**, producto del metabolismo del parásito y que no se colorea, pero tiene su propio color, que puede ir desde un amarillo pálido hasta café oscuro o negro, y los **gránulos de Schüffner**, que aparecen en casos de infección por *P. vivax* y *P. ovale* como un punteado rosado, y su observación depende de la calidad del colorante, el pH del buffer y el tiempo de coloración. (FIGURA 11)

FIGURA 11: Morfología y coloración del trofozoito en el frotis delgado





## 5.2. ASPECTO DE LOS ESTADIOS DEL PARÁSITO

El *Plasmodium* presenta diferentes estadios en el hombre, cada uno con morfología característica según la especie: los **estadios asexuados**, que comprenden a los trofozoitos, esquizontes, y **estadios sexuados**, los gametocitos. Durante la examinación de la muestra pueden no apreciarse todos los estadios.

### **Trofozoitos**

Los trofozoitos son los estadios que se encuentran con mayor frecuencia durante la examinación de las muestras de sangre, los cuales se observan comúnmente con la forma de “anillos”, pero también se presentan con formas de coma o más irregulares, según la especie en cuestión, con un punto de cromatina, y en casos de *P. falciparum*, pueden ser dos.

El trofozoito va aumentando de tamaño, o creciendo, dentro del glóbulo rojo, y a medida que esto ocurre va apareciendo el pigmento malárico.

### **Esquizonte**

El parásito en esta fase empieza a reproducirse de forma asexuada dentro del glóbulo rojo, por simple división binaria. Pueden observarse desde dos fragmentos de cromatina hasta aquellos con varios parásitos, con cromatina y citoplasma definidos. El número de núcleos observados pueden ser de utilidad para determinar la especie.

### **Gametocito**

Consiste en el estadio sexual, que puede ser hembra (macrogametocito) o macho (microgametocito). La morfología de los gametocitos depende de la especie, pueden tener forma redonda o forma de banana o luna creciente.

**Durante la examinación de la muestra, se deben tener en cuenta las siguientes características:**

- Cuando la infección es producida por *P. vivax*, es posible encontrar todos los estadios: trofozoitos, esquizontes y gametocitos. La presencia del punteado de Schüffner y el aumento del tamaño de los glóbulos rojos confirman el diagnóstico de esta especie.
- Si la infección es por *P. falciparum*, sólo se observan trofozoitos, a menudo en gran número, con eritrocitos multiparasitados, y los gametocitos característicos. En casos de infección grave o severa por esta especie, pueden además observarse los esquizontes y trofozoitos maduros.

### 5.3. ASPECTOS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE *PLASMODIUM*

La identificación de la especie de *Plasmodium* infectante se basa en el aspecto morfológico que el mismo presenta en la gota gruesa y el frotis delgado, y el efecto que producen en los glóbulos rojos. (TABLAS 6, 7, 8, 9).

#### **En la gota gruesa**

En la gota gruesa los parásitos y los componentes normales de la sangre se observan más pequeños que en el frotis y el citoplasma fino de los trofozoitos más jóvenes puede estar incompleto o interrumpido.

#### **En el frotis**

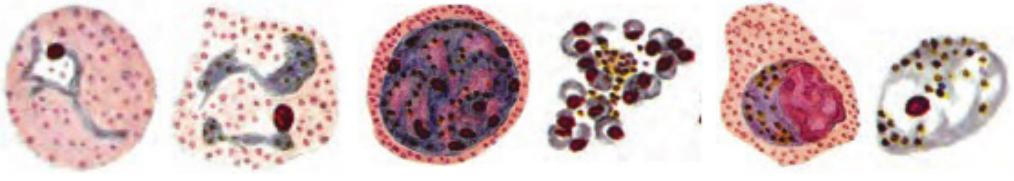
El frotis delgado resulta de gran utilidad para la diferenciación de la especie del parásito, pues el efecto que los parásitos producen sobre el glóbulo rojo (aumentado o no de tamaño, o distorsionado) es característico para cada una.

**TABLA 6: Características morfológicas de *P. falciparum***

	TROFOZOITOS	ESQUIZONTES	GAMETOCITOS
GOTA GRUESA	Anillos o comas, pequeños a medianos. A menudo con dos puntos de cromatina, citoplasma regular, fino y delicado. Las formas maduras tienen pigmentos gruesos y oscuros.	Son pequeños y compactos, presentan 12 a 30 (o más) merozoitos pequeños. Pigmento oscuro.	Formas de banana o salchicha, cromatina única, difusa (microgametocito) o una sola masa (macrogametocito). Pigmento: con forma de granos de arroz, oscuros.
FROTIS	Eritrocitos de tamaño normal, pueden estar multiparasitados.	Eritrocitos de tamaño normal.	Los eritrocitos se observan distorsionados por la forma del parásito.
IMAGEN			

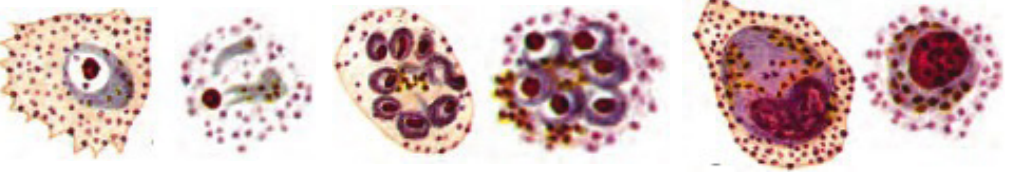
Fuente: OMS

**TABLA 7: Características morfológicas de *P. vivax***

	<b>TROFOZOITOS</b>	<b>ESQUIZONTES</b>	<b>GAMETOCITOS</b>
<b>GOTA GRUESA</b>	Anillos rotos y formas irregulares, pequeños a grandes, citoplasma ameboso, irregular o fragmentado. Cromatina única y grande. Pigmento disperso y fino, café a amarillo.	Grandes, formado por 12 a 24 merozoitos, generalmente 16, en conglomerados irregulares. Pigmento: masa suelta, café a amarillo.	Redondas u ovals y grandes, cromatina única, difusa (microgametocito) o compacta y excéntrica (macrogametocito). Pigmento: disperso, fino color café. Pueden ser difíciles de distinguir de los trofozoitos maduros.
<b>FROTIS</b>	El eritrocito se encuentra agrandado (hasta 2 veces más grande) y puede estar distorsionado. Gránulos de Schüffner finos ocasionales.	Eritrocito agrandado (hasta 2 veces más grande) y puede estar distorsionado. Gránulos de Schüffner finos.	Eritrocito agrandado (hasta 2 veces más grande) y puede estar distorsionado. Gránulos de Schüffner finos.
<b>IMAGEN</b>			

Fuente: OMS

**TABLA 8: Características morfológicas de *P. ovale***

	<b>TROFOZOITOS</b>	<b>ESQUIZONTES</b>	<b>GAMETOCITOS</b>
<b>GOTA GRUESA</b>	Anillo con citoplasma grueso y cromatina grande. Pigmento disperso y grueso, color café oscuro.	Forma madura con 6 a 14 merozoitos, con cromatinas grandes alrededor de una masa de pigmento oscuro.	Redondo a oval, citoplasma compacto, cromatina difusa (microgametocito) o compacta y excéntrica (macrogametocito). Pigmento café disperso.
<b>FROTIS</b>	Eritrocitos ligeramente aumentados de tamaño, pueden estar distorsionados, algunas veces fimbriados. Puede observarse punteado de Schüffner a lo largo de la célula.		
<b>IMAGEN</b>			

Fuente: OMS



**TABLA 9: Características morfológicas de *P. malariae***

	TROFOZOITOS	ESQUIZONTES	GAMETOCITOS
GOTA GRUESA	Anillos rotos y formas irregulares, de pequeños a grandes. Cromatina única y grande, citoplasma irregular o fragmentado. Pigmento disperso y fino.	Son grandes, con 6 a 12 merozoitos (8 en promedio), con cromatina grande, conglomerados alrededor de una masa de pigmento café oscuro, como formas en margarita.	Redondo a oval, compacto. Cromatina difusa (microgametocitos) o compacta y excéntrica (macrogametocitos). Pigmento: disperso, café.
FROTIS	Eritrocitos de tamaño normal o menor a lo normal (3/4 de su tamaño).		
IMAGEN			

Fuente: OMS

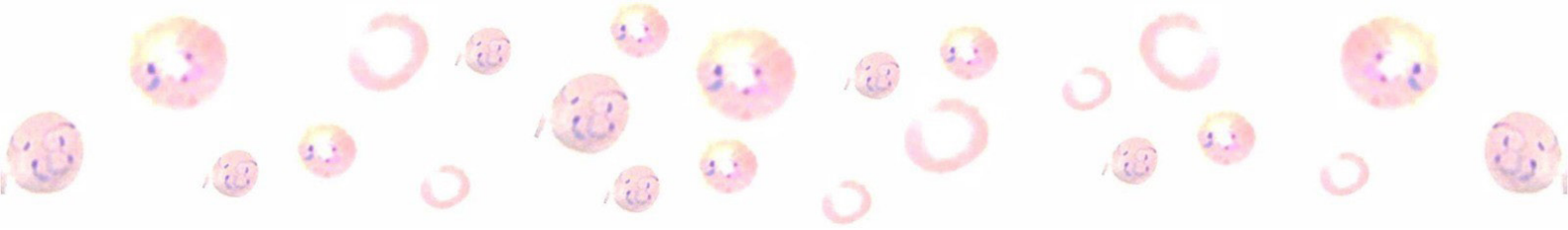
## 5.4. INFECCIÓN MIXTA

La infección mixta se define como la presencia de más de una especie de *Plasmodium* en un huésped, en cualquier combinación y número, siendo la más frecuente la producida por *P. falciparum* y *P. vivax*.

La identificación de este tipo de infección es muy difícil en la práctica, pues la diferenciación de los trofozoitos jóvenes de las cinco especies es dificultosa, además, generalmente, una de las especies se encuentra circulando en menor densidad que la otra, pudiendo estar por debajo del umbral de detección o también permanecer como estadios latentes en hígado.

Si bien no se cuentan con criterios claros para el diagnóstico de este tipo de infecciones por microscopía, éste depende de la detección de formas características de cada especie, como la observación de gametocitos de *P. falciparum* con otras formas características de *P. vivax*. Debido a que no siempre es posible observar a los gametocitos, se podría sospechar de una infección mixta de estas dos especies cuando se observe una proporción alta de anillos de *P. vivax*, además de anillos pequeños sin punteado de Schüffner evidente, ni aumento del tamaño de los eritrocitos (frotis delgado).

Aún con estos criterios, la posibilidad de no detectar una infección mixta es muy alta, y el único método que permite detectarla con exactitud es la PCR, por lo tanto se recomienda que se remitan todas las muestras positivas al Laboratorio de Referencia para la confirmación mediante técnicas moleculares.



## 5.5. ARTEFACTOS

Durante la examinación de la muestra pueden observarse artefactos que pueden producir confusión y dificultar el diagnóstico, sin embargo, algunos de ellos pueden ser prevenidos, como los hongos, al utilizar láminas limpias y reactivas sin contaminantes. Existen otros contaminantes ambientales que pueden depositarse en las muestras, como bacterias y partículas de polvo.

Además de artefactos externos, también se pueden detectar otros parásitos o microorganismos presentes en las muestras, los cuales deben ser informados.



## CAPÍTULO 6: DENSIDAD PARASITARIA

La densidad parasitaria se realiza una vez que se haya determinado la especie de *Plasmodium* infectante y consiste en un método cuantitativo sencillo utilizado para conocer la cantidad de parásitos por microlitro de sangre que presenta el paciente. Puede realizarse a partir de la gota gruesa o el frotis delgado, y solo requiere de un contador de células y una calculadora.

Este valor se halla mediante el recuento simultáneo de la cantidad de parásitos y de glóbulos blancos observados por campo, con relación a la cantidad de glóbulos blancos total del paciente.

Al determinar la parasitemia se deben contar por separado los estadios asexuados sanguíneos o “eas” (trofozoitos y esquizontes) de los sexuados o “ess” (gametocitos), debido a que son los estadios asexuados los responsables de las manifestaciones clínicas y las complicaciones.

En casos de infecciones mixtas, se debe realizar el recuento según especie, separando a su vez cada estadio observado.

### ***El cálculo de la densidad parasitaria sirve para:***

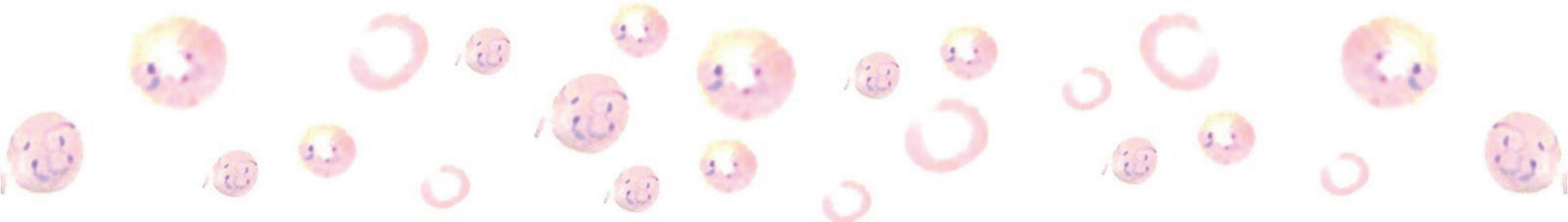
- Determinar la gravedad de la infección, en especial cuando se tratan de infecciones por *P. falciparum*, las cuales tienden a ser peligrosas.
- Evaluar la respuesta al tratamiento antimalárico: Permite vigilar la susceptibilidad in vivo a las drogas esquizotónicas sanguíneas como la cloroquina.

### 6.1. ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA EN LA GOTA GRUESA

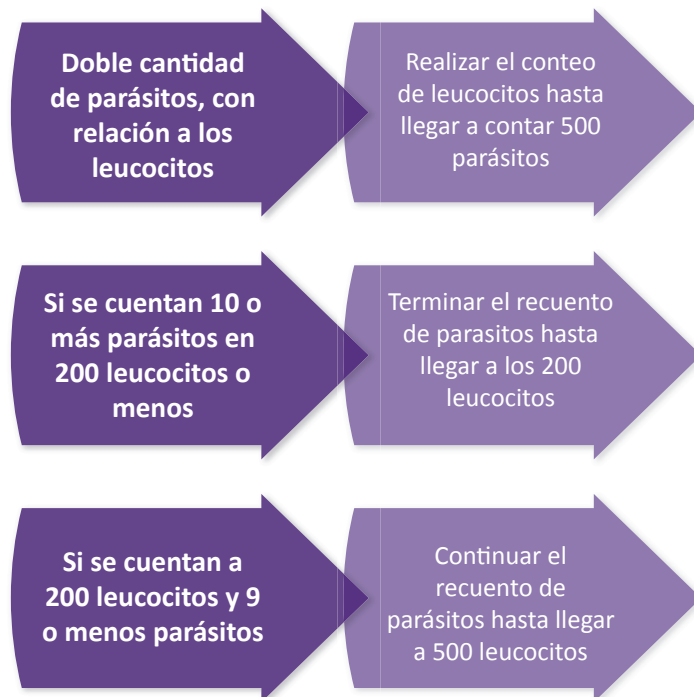
El proceso de recuento de parásitos es más rápido y sencillo si se realiza a partir de la gota gruesa, por ser una muestra en la que los componentes celulares de encuentran más concentrados.

El procedimiento a realizar es el siguiente:

1. Se realiza la exploración de la muestra desde un extremo seleccionado, siguiendo un movimiento en zigzag, evitando así volver a pasar por un campo ya observado. El recuento empieza a partir de la observación del primer parásito.
2. Se designa una tecla del contador para el estadio asexuado del *Plasmodium*, otro para el sexuado y por último, uno para los leucocitos.



3. Se realiza el conteo simultáneo de parásitos y leucocitos observados. No se deben contar los leucocitos destruidos o que no se encuentren completamente en el campo de observación. La cantidad a contar varía según lo siguiente:



En caso de infecciones mixtas, estas reglas se aplican de forma individual por especie, pudiendo ser el recuento, por ejemplo, hasta 200 leucocitos para una especie y hasta 500 leucocitos para la otra.

Con los valores obtenidos se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Parásitos}/\mu\text{L} = \frac{\text{Nro. de parásitos contados} \times 6000 \text{ leucocitos}/\mu\text{L}^*}{\text{Nro. de leucocitos contados}}$$

\*Se utiliza 6000 leucocitos/ $\mu\text{L}$  como constante cuando no se dispone del resultado del hemograma.

## 6.2. ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA EN EL FROTIS DELGADO

Si la parasitemia se calcula a partir del frotis se obtiene como resultado el porcentaje de glóbulos rojos parasitados, el cual puede traducirse también en número de parásitos por microlitro, si se conocen los valores hematológicos o se utilizan las constantes recomendadas.

Procedimiento:

- a. Para realizar el recuento se localiza una zona en el frotis en que los campos sean uniforme, hacia el extremo distal o cola.
- b. Se cuenta el número de glóbulos rojos en un campo y se calculan cuantos campos se necesitan para llegar a 10.000 glóbulos rojos.
- c. Luego se cuentan los glóbulos rojos parasitados hasta llegar al número campo calculado previamente. Tener en cuenta que aunque un eritrocito de encuentre multiparasitado, igualmente cuenta como uno.
- d. Para expresar el resultado en porcentaje de glóbulos rojos (GR) parasitados, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\text{nro. de GR parasitados} \times 100}{10.000 \text{ GR}}$$

Se considera 1% como una parasitemia elevada, y 5% como hiperparasitemia.

- e. A modo de estandarizar el diagnóstico emitido por los laboratorios, se recomienda informar parásitos/ $\mu\text{L}$ , aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\text{nro. de GR parasitados} \times 5.000.000 / \mu\text{L}}{10.000 \text{ GR}}$$

\*Cuando no se dispone de los parámetros hematológicos se asume como valor constante 5.000.000 glóbulos rojos/ $\mu\text{L}$ .



# CAPÍTULO 7: INFORME DE RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

## 7.1. INFORME DE RESULTADOS

### Resultado Negativo

Cuando no se detectaron parásitos (*Plasmodium*, u otros como *Babesia*, *Trypanosoma*, microfilarias) tras la observación de 500 campos en la gota gruesa (800 en el frotis delgado). Se informa de la siguiente manera: **“No se observan parásitos en 500 campos”**

Un diagnóstico negativo de malaria por microscopía no descarta la enfermedad y, por lo tanto, se recomienda que **ante sospecha clínica y epidemiológica**, con resultado de la observación microscópica de la muestra negativo, se repita el examen cada 8 a 12 horas, por un mínimo de tres días, o hasta que se pueda descartar el diagnóstico de malaria con seguridad.

Los resultados falso negativos pueden deberse a lo siguiente:

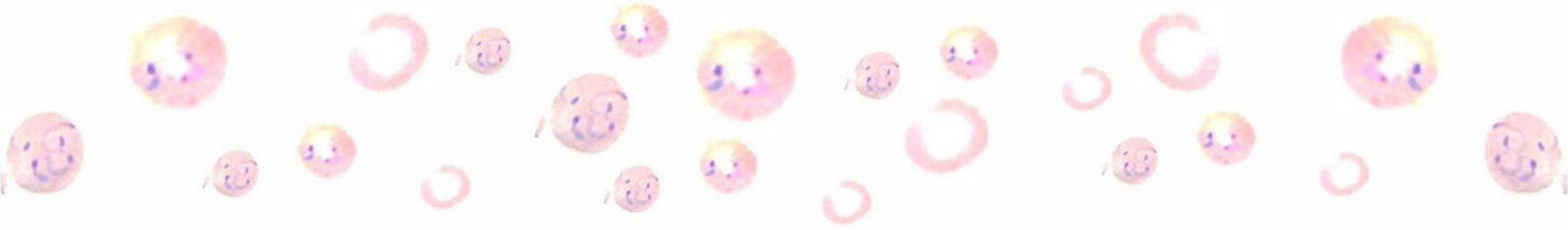
- En infecciones por *P. falciparum*, debido al proceso de secuestro de los parásitos en los capilares, y por lo tanto no siempre se los observa en sangre periférica.
- El paciente recibió un tratamiento antimalárico, pero sin completarlo.
- Los parásitos son escasos, y no pueden ser detectados en sangre periférica.
- Debido a la inmunidad en pacientes que ya han sufrido infecciones por *Plasmodium* sp. varias veces, se puede mantener una parasitemia baja, no detectable por microscopía, y ser además un paciente asintomático.

### Resultado Positivo

Cuando se evidencia la presencia de *Plasmodium* spp. Se informa la especie o especies identificadas, los estadios encontrados y la densidad parasitaria (Ver ejemplo en TABLA 10)

TABLA 10: Ejemplos de informe de resultados		
RESULTADO	ESPECIE	DENSIDAD PARASITARIA
Positivo	<i>Plasmodium vivax</i>	2.000 eas// $\mu$ L 680 ess/ $\mu$ L
	<i>Plasmodium falciparum</i>	19.600 eas/ $\mu$ L 110 ess/ $\mu$ L
Positivo	<i>Plasmodium vivax</i>	120 eas/ $\mu$ L

\*eas: estadios asexuados sanguíneos; ess: estadios sexuados sanguíneos



Cuando se obtiene una parasitemia muy baja, menor a 100 parásitos/ $\mu$ L (entre 2 a 3 parásitos en toda la muestra), el diagnóstico debe ser confirmado. Se recomienda repetir el examen luego de 8 a 12 horas del diagnóstico inicial. La interpretación de la densidad parasitaria puede observarse en la TABLA 11.

TABLA 11: Correlación entre la parasitemia y la clínica del paciente	
Parásitos/ $\mu$ L	Correlación clínica
5 - 10	Límite de detección de la microscopía de gota gruesa
100	Límite de detección de las tiras rápidas
10.000	Nivel por encima del cual los pacientes inmunes presentan síntomas
100.000	Parasitemia máxima en <i>P. vivax</i> y <i>P. ovale</i> . Parasitemia alta para <i>P. falciparum</i> , riesgo de malaria complicada.
100.000 a 250.000	Hiperparasitemia, malaria complicada, riesgo de muerte.
500.000	Riesgo alto de muerte.

## 7.2 EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTIMALÁRICO

Se considera que un paciente se encuentra completamente curado cuando se produce la eliminación total de los parásitos causantes de esta enfermedad. Esto es evaluado mediante el control de la parasitemia por microscopía, por periodos de tiempo establecidos según la especie infectante, a modo de detectar posibles fallas terapéuticas. Los periodos establecidos son los siguientes:

- *P. vivax*: Se realiza un control a los 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 42 y a los 63 días del inicio del tratamiento.
- *P. falciparum*: Controles a los 1, 2, 3, 7, 21 y 28 días de iniciado el tratamiento.

Si existe éxito terapéutico, la densidad parasitaria debería disminuir al segundo día del tratamiento, y no deben observarse parásitos en la gota gruesa a partir del tercer día.

Cada lámina tomada en esos días debe identificarse de forma diferente a la lámina inicial, indicando el número de control al cual corresponde.





## CAPÍTULO 8: PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (PDR)

Las pruebas de diagnóstico rápido, también conocidas como tiras rápidas o inmunocromatográficas, presentan la principal ventaja de otorgar un resultado rápido y confiable, en tan sólo 15 a 20 minutos, con una sensibilidad igual o mayor a 95%. Si bien, la microscopia de la gota gruesa es el estándar de oro en el diagnóstico de malaria, no siempre puede ser implementado o mantenido con una calidad adecuada, pues requiere de un microscopista entrenado y un sistema de aseguramiento de la calidad instalado, por lo tanto, las PDR resultan de gran utilidad para obtener un diagnóstico oportuno.

### 8.1. FUNDAMENTO DE LAS TIRAS RÁPIDAS

Las PDR se basan en la detección del antígenos (proteínas), producidos por el parásito del género *Plasmodium*, que se encuentran circulando en la sangre del individuo infectado, mediante la formación de un complejo antígeno-anticuerpo en una fase móvil, la cual migra por una tira de nitrocelulosa embebida a su vez por anticuerpos específicos que capturan el complejo formado, con la consecuente obtención de una banda coloreada.

**Límite de detección:** >100 parásitos/ $\mu$ L. La capacidad de detección de las tiras depende además de la especie de parásito infectante, variaciones en el antígeno, viabilidad del parásito, del estado de las tiras y su correcto uso e interpretación.

### 8.2. ANTÍGENOS DETECTADOS POR LAS PDR

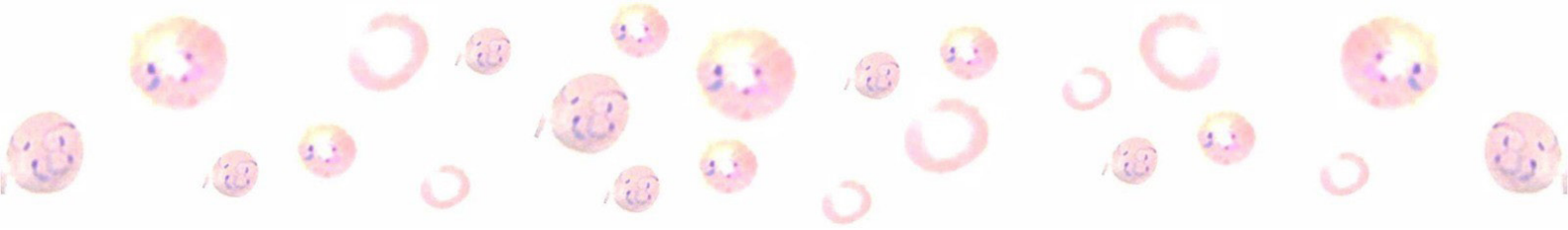
#### ***Proteína rica en Histidina II (HRP II)***

Las HRP II es una molécula hidrosoluble, expresada en la membrana de glóbulos rojos parasitados por trofozoitos, esquizontes, y gametocitos inmaduros, de *P. falciparum*.

Este antígeno puede persistir en circulación 1 semana o más luego de terminada una terapia antimalárica efectiva, sin que se detecten parásitos circulantes en sangre (resultado de la gota gruesa negativo), por lo tanto no puede ser utilizado para evaluar el tratamiento.

#### ***Lactato deshidrogenasa de Plasmodium (pLDH)***

Enzima intracelular que participa en la vía glucolítica del parásito durante el ciclo eritrocítico. La pLDH es producida por los estadios asexuados y sexuados, con isómeros específicos para cada especie, detectando la forma viable del parásito.



Existen pruebas en el mercado específicas para las especies *P. vivax* y *P. falciparum*, y pruebas que detectan las cuatro especies en una misma banda (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), sin especificar cuál de ellas es la causante de la infección, y se conocen como tiras pan-maláricas.

### **Aldolasa**

Esta enzima también participa de la vía glucolítica del *Plasmodium*, común en las 4 especies, es decir, no es específica, lo cual se denomina “pan malárico”.

## 8.3. USO E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La muestra requerida para la realización de las tiras rápidas es sangre capilar, obtenida por el pinchazo del dedo de la mano (Procedimiento en Capítulo 3), o sangre con EDTA obtenida por punción venosa. El procedimiento es muy sencillo de realizar, y deben seguirse los pasos detallados en el inserto del reactivo.

La lectura e interpretación de las PDR sólo pueden ser realizadas si la banda que corresponde al control se encuentra coloreada, de lo contrario se considera un resultado inválido, y se debe repetir la prueba.

Los resultados se interpretan teniendo siempre en cuenta la clínica del paciente, considerando la posibilidad de resultados falsos negativos o positivos, y deben ser confirmados siempre con la microscopía de la gota gruesa.

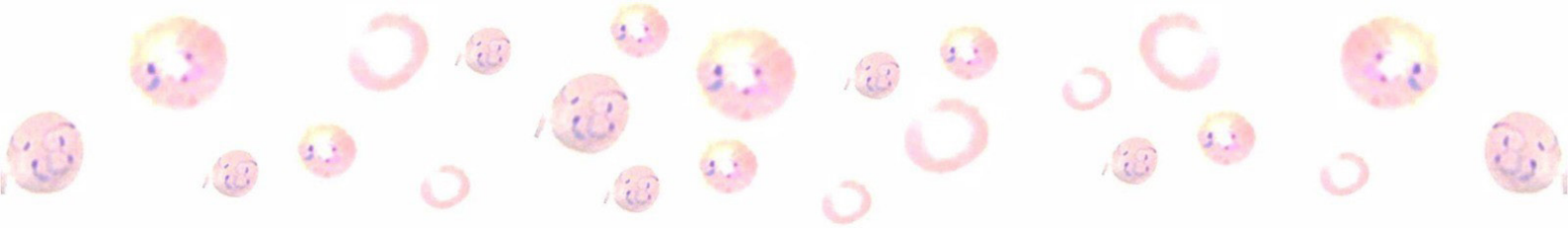
**Resultado falso negativo:** Esto puede deberse a factores como parasitemias menores al límite de detección, variación en la proteína HRP II, la cual no se produce o lo hace en bajas concentraciones, una PDR defectuosa o a que la especie infectante no es detectada por la tira en uso.

**Resultado falso positivo:** Si bien los casos falsos positivos son raros, se debe tener presente que el antígeno HRP II persiste en circulación aún terminado un tratamiento exitoso, y además se han registrado casos de reacción cruzada con otros antígenos presentes en sangre, como el factor reumatoideo en el caso de HRP II y leishmaniasis en el caso de LDH.

## 8.4. ELECCIÓN DE LA PDR

La selección de la PDR a ser utilizada en un laboratorio debe ser realizada tras el análisis de varios factores, como la especie predominante en la región, la disponibilidad de lugares adecuados para su almacenamiento, además de la relación costo-beneficio, en especial considerando que nuestro país no registra casos autóctonos desde el 2011.

Otro factor muy importante a considerar cuando se desea adquirir estas pruebas es el porcentaje de sensibilidad que presentan, siendo el valor recomendado por la OMS del 95% - 100% (para



una densidad mayor a 100 parásitos/ $\mu$ L en una infección por *P. falciparum*), además se pueden utilizar como guía materiales bibliográficos referentes al desempeño que presentan en campo de acción, en especial el manual “Malaria Rapid Diagnostic Test Performance” emitido por la OMS en rondas determinadas, el cual evalúa la calidad de las PDR producidas por los principales fabricantes y distribuidores de este producto.



## CAPÍTULO 9: RED NACIONAL DE LABORATORIO

La organización de la Red Nacional de Laboratorios (RNL) fue establecida el 16 de febrero de 2012 según la Resolución S.G. N° 91, *por la cual se aprueba la estructura funcional de laboratorios en la red integrada de servicios de salud en el Paraguay.*

Este proyecto pone a consideración tres niveles de resolución: Nivel Nacional, Nivel Regional y Nivel Local.

- **Nivel Nacional:** con un laboratorio de Referencia Nacional como institución rectora, el Laboratorio Central de Salud Pública.

El Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP) se establece como cabecera de la Red según la Resolución Ministerial S.G. N° 230, del 22 de junio de 1999, *por la cual se autoriza al Laboratorio Central de Salud Pública a asumir la función Normativa, Coordinadora y de Referencia de todos los Laboratorios de Análisis Clínicos y de Salud Pública, dependientes del M.S.P. y B.S.*

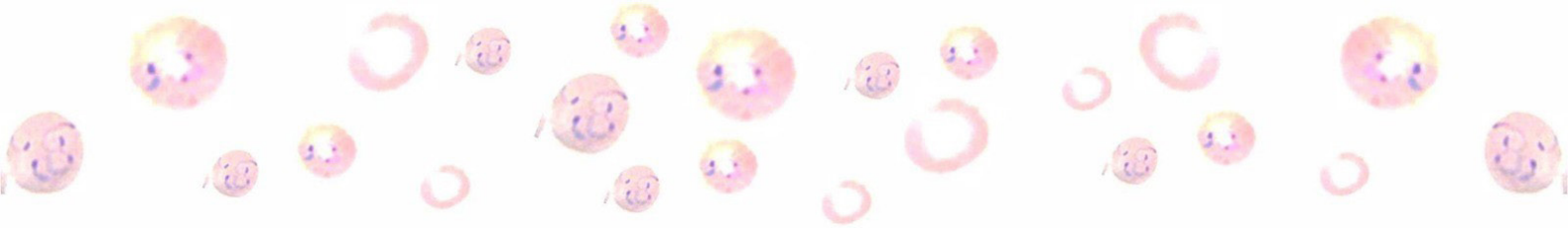
- **Nivel Regional:** donde se incluyen a los laboratorios de las Regiones Sanitarias, los laboratorios de los Hospitales Generales y Centros Especializados.
- **Nivel Local:** donde se incluyen los laboratorios de los Hospitales Distritales, de los Hospitales Materno Infantiles, las Unidades de Diagnóstico de Malaria (UDM) del SENEPA, Centros de Salud, Policlínica, Centros de Ambulatorios de Especialidades (CAE), Unidades de Salud de la Familia (USF) y Puestos de Salud.

Además de estas instituciones, la RNL para el diagnóstico de malaria incluye a instituciones privadas y otras no dependientes del MSPBS, con el propósito de aumentar la cobertura del diagnóstico en todo el país.

### 9.1. PRINCIPALES FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS EN EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA

#### **Laboratorio de Referencia Nacional → LCSP**

- Contar con la infraestructura, equipamiento, tecnología y otros recursos, necesarios para llevar a cabo las actividades de referencia contempladas en los reglamentos y estatutos.
- Participar en programas de evaluación externa del desempeño con organismos internacionales de reconocido prestigio.



- Estandarizar y normalizar procesos y procedimientos de la Red Nacional de Laboratorios.
- Elaborar protocolos de laboratorio que faciliten la ejecución de procedimientos.
- Coordinar y supervisar la Red Nacional de Laboratorios.
- Definir los criterios (estándares de calidad) de inclusión de los laboratorios en la RNL por niveles resolutivos.
- Evaluar a los laboratorios de la RNL a través de programas de evaluación externa de calidad (PEED), controles directos e indirectos.
- Analizar y procesar todos los pedidos de gota gruesa, y emitir un resultado en tiempo y forma, según los procedimientos estandarizados.
- Realizar el seguimiento del paciente, mediante el análisis microscópico de las muestras tomadas en días establecidos, posteriores al inicio del tratamiento, según normas nacionales estipuladas:

*P. vivax*: Se realiza un control a los 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 42 y a los 63 días del inicio del tratamiento.

*P. falciparum*: Controles a los 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 días de iniciado el tratamiento

- Apoyar el diagnóstico realizado por los laboratorios de la RNL, mediante la confirmación de los resultados emitidos, y resolver discrepancias si las hubiere.
- Contar con personal capacitado en el diagnóstico de malaria por centros regionales internacionales de referencia.
- Capacitar y actualizar a los laboratorios integrantes de la red.
- Elaborar y presentar la propuesta de las actividades a ser desarrolladas en la Red con carácter anual
- Diseñar los objetivos e indicadores de evaluación con carácter anual
- Elaboración y presentación de un informe de evaluación anual de las actividades desarrolladas por la Red y su socialización a las autoridades según niveles resolutivos
- Notificar los resultados de análisis confirmados a la DGVS y SENEPA
- Asegurar que cumplan un diagnóstico de calidad en las metodologías realizadas

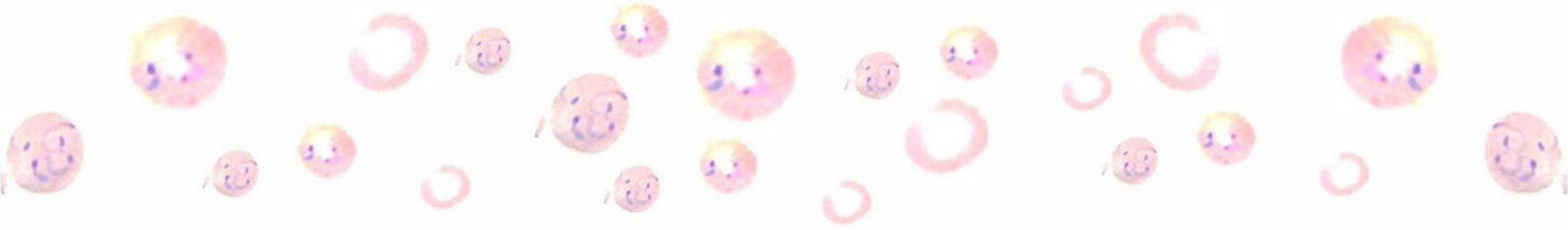


### **Laboratorio del nivel Regional, Local y Centros Especializados**

- Asegurar y mantener los servicios de laboratorio en la atención de los pacientes en términos de cobertura, accesibilidad, oportunidad y calidad.
- Garantizar la continuidad de los servicios de RNL durante 24 horas, 7 días a la semana y durante todo el año.
- Analizar y procesar todos los pedidos de gota gruesa, y emitir un resultado en tiempo y forma.
- Operar bajo procedimientos estandarizados, incorporando metodologías validadas en la oferta de servicios.
- Participar y mantener un desempeño óptimo en programas de evaluación externa disponibles a nivel nacional e internacional, realizar además el control interno y control indirecto de cada lámina, aplicando y documentando medidas correctivas.
- Asegurar la capacitación y actualización continua del personal técnico y administrativo.
- Desarrollar capacidades para la identificación, caracterización y notificación de brotes epidémicos.
- Desarrollar las actividades previstas de acuerdo a los objetivos propuestos por el Laboratorio de Referencia Nacional LRN-LCSP
- Asegurar un diagnóstico de calidad en las metodologías empleadas
- Participar de las Capacitaciones y/o entrenamientos impartidos por el LNR-LCSP con la responsabilidad de replicar a los bioquímicos de su laboratorio.
- Contribuir al Sistema Nacional de Vigilancia de manera integrada, con información de calidad.
- Promover la colaboración inter institucional, trabajando en conjunto con el personal de SE-NEPA, DGVS y médicos encargados del caso.
- Realizar el seguimiento del paciente, mediante el análisis microscópico de las muestras tomadas en días establecidos, posteriores al inicio del tratamiento, según normas nacionales estipuladas:

*P. vivax*: Se realiza un control a los 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 42 y a los 63 días del inicio del tratamiento.

*P. falciparum*: Controles a los 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 días de iniciado el tratamiento



## 9.2. ACTIVIDADES A REALIZAR EN RELACIÓN A LAS FUNCIONES DEL LCSP

### **a. Diagnóstico**

- Transmitir en las jornadas de capacitación el procedimiento recomendado para la realización del diagnóstico y el algoritmo acordado para la estandarización del procesamiento de las muestras.
- Difundir el procedimiento recomendado de control de calidad y los resultados del informe de evaluación y los objetivos del próximo año.

### **b. Comunicación e Intercambio de Información**

- Estructurar una plataforma WEB para facilitar la comunicación y el intercambio de información entre los profesionales.

### **c. Formación**

- Detectar y elaborar un listado de las necesidades de formación en función de las discusiones mantenidas por los profesionales y de las solicitudes presentadas por los miembros de la RED.
- Establecer Foros de encuentro en la cual tratar los aspectos que se consideren oportunos en relación al diagnóstico.

### **d. Evaluación**

- Cada año se establecerán los objetivos anuales y los indicadores, que se diseñaran posterior a la evaluación del desempeño de los laboratorios para la medición de su cumplimiento.
- El LRN realizará una evaluación con su correspondiente informe final que será enviada a las direcciones de las instituciones integrantes de la RED.

## 9.3. LA RNL EN EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA

Según la Resolución S. G. N° 91, que establece la cartera mínima de servicio de los distintos niveles, todos los laboratorios de la red deben ser capaces de realizar el diagnóstico de malaria mediante la observación microscópica de la gota gruesa.

Cada laboratorio debe contar con personal capacitado para la detección de malaria por microscopía, y debe seguir los lineamientos establecidos para el diagnóstico de esta patología. Todos los casos sospechosos analizados a nivel local, UDM o laboratorios privados deben ser notificados y las muestras remitidas al nivel Regional.



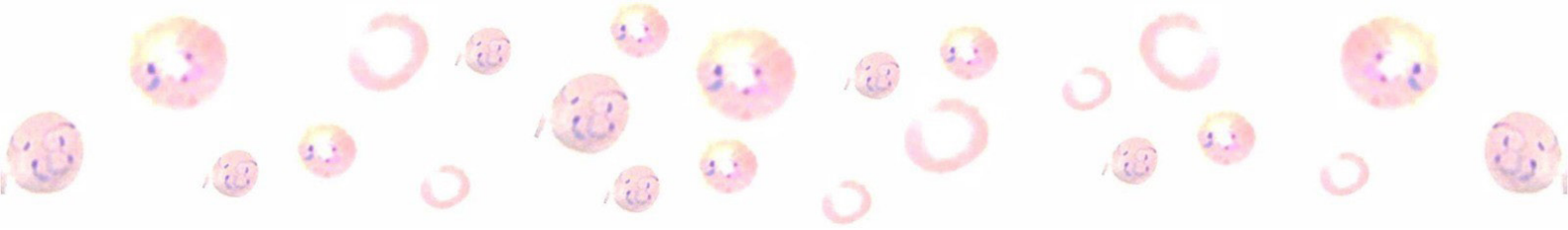
Según el nivel de complejidad de los laboratorios de la Red, se establece el poder resolutivo en el diagnóstico de malaria para el nivel nacional, regional y centros especializados, nivel local y las Unidades de diagnóstico de malaria del SENEPA (UDM) (DIAGRAMA 1).

**DIAGRAMA 1:** Capacidades diagnósticas de la RNL, según niveles de resolución



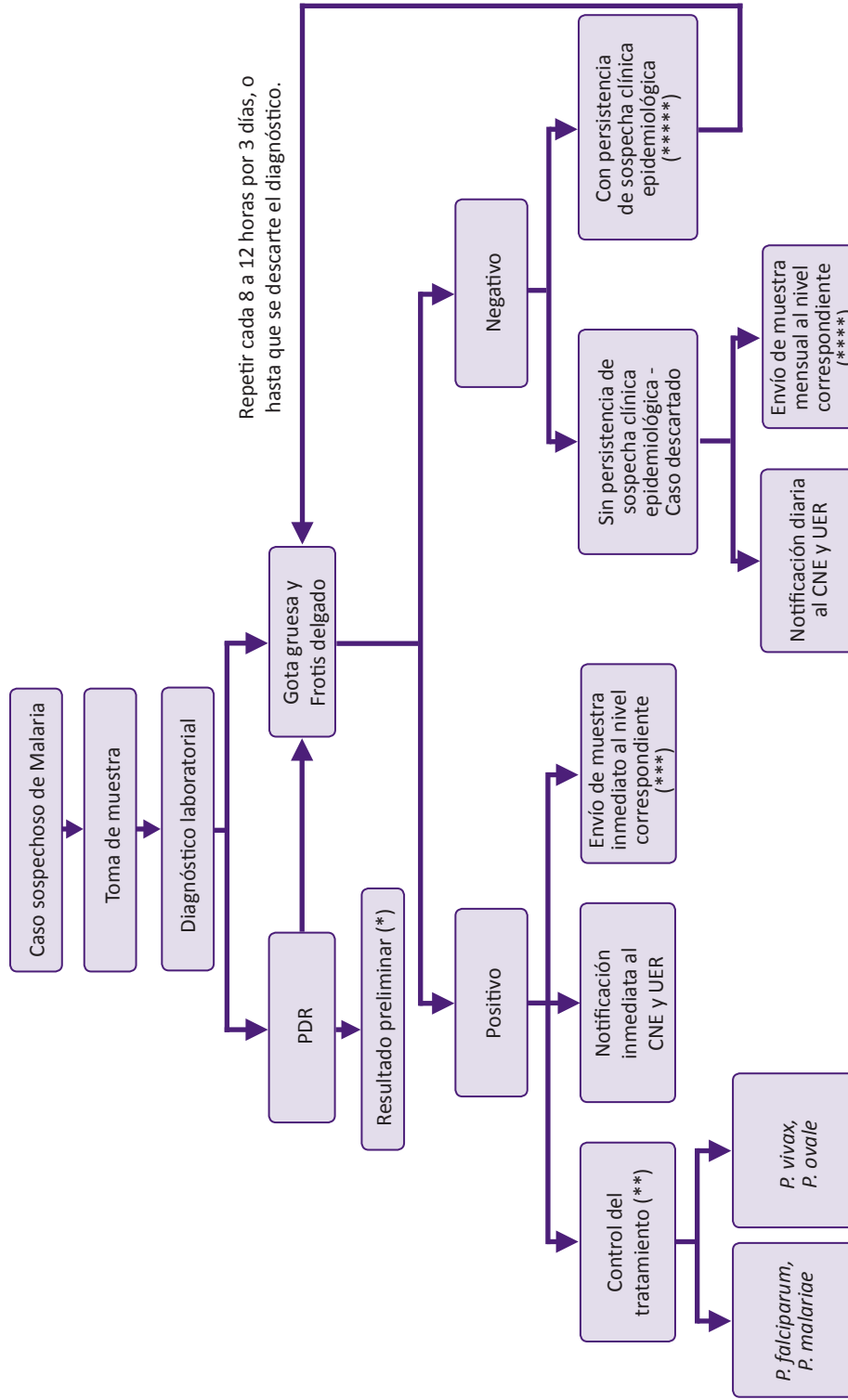
### **Lineamientos para el diagnóstico de malaria en el país (ALGORITMO 1)**

- El diagnóstico microscópico de la gota gruesa se debe realizar dentro de las 24 horas desde la toma de muestra, a toda persona sintomática que reside o haya viajado a zonas donde existe transmisión activa de malaria, además de pacientes asintomáticos captados por el sistema de vigilancia (siguiendo criterios epidemiológicos).
- Se debe realizar un mínimo de tres láminas por paciente, preferentemente antes de que se administre un tratamiento antimalárico, de ser posible durante el pico febril, donde se espera encontrar una mayor parasitemia.
- Los establecimientos que cuenten con PDR deben realizar la toma de muestra para las tiras rápidas y las láminas de gota gruesa y frotis de forma simultánea. El resultado de las tiras rápidas se podrá informar como preliminar, con la posterior confirmación obligatoria por microscopía, donde se emitirá el resultado final y se completará el esquema de diagnóstico (especie, estadio y densidad parasitaria).
- Ante un primer resultado de la observación microscópica negativa con persistencia de la sospecha clínica y epidemiología de malaria, se debe repetir el examen cada 8 a 12 horas por un mínimo de 3 días, o hasta que el resultado pueda ser descartado con seguridad. En estos casos se recomienda remitir al LCSP una muestra de sangre con EDTA o en papel de filtro, para la confirmación por técnicas moleculares.
- Ante un resultado positivo, registrado en:
  - Laboratorios del Nivel Local: Remitir las láminas y una muestra de sangre con EDTA, o en papel de filtro, al Hospital Regional para completar el esquema de diagnóstico (estadios y densidad parasitaria). Notificar inmediatamente al Centro Nacional de Enlace (CNE), a la Unidad Epidemiológica Regional (UER) correspondiente y al LCSP.



- Laboratorios privados o no dependientes del MSPBS: Remitir láminas y una muestra de sangre con EDTA o en papel de filtro, al LCSP, o al Nivel Regional (Hosp. Regionales o Centros Especializados).
  - Laboratorios del Nivel Regional: Notificar al CNE, la UER correspondiente y al LCSP. Remitir al LCSP todas las láminas positivas y una muestra de sangre con EDTA o en papel de filtro, en la brevedad posible. El envío de muestras se debe realizar tanto para casos diagnosticados en este servicio como para todas las muestras remitidas por los niveles locales, privados y otras instituciones.
- Se debe realizar el seguimiento o control del tratamiento de todos los pacientes que presenten un resultado positivo para malaria.
  - Todos los resultados, tanto positivos como negativos, deben ser notificados al **CNE**, la **UER** y al **LCSP**, utilizando la **Planilla Consolidada de Resultado Laboratorial de Malaria** (ANEXO VI).
  - Todas las muestras remitidas al LCSP deben ir acompañadas de una copia de la ficha Lab1 y de la ficha epidemiológica (Ficha SFA u otra ficha diseñada para tal uso) (ANEXO VI).

**ALGORITMO 1: Diagnóstico de la Malaria**



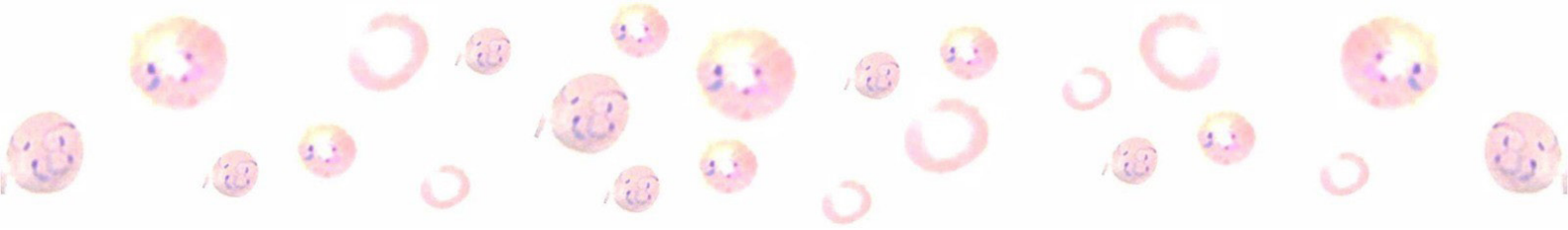
\* El informe del resultado de la PDR es preliminar. Útil sobre todo en casos positivos, a fin de acelerar el inicio del tratamiento.

\*\* La toma de muestra para el control del tratamiento es realizado por auxiliares de evaluación o colaboradores voluntarios o personal del laboratorio (si el paciente acude para el control), y las muestras serán remitidas al laboratorio más cercano, indicando a que control corresponde.

\*\*\* Las muestras enviadas son las láminas de gota gruesa y extendido fino, y sangre con EDTA o en papel de filtro.

\*\*\*\* La muestra enviada son las láminas de cada paciente, según el porcentaje establecido en capítulo de control de calidad.

\*\*\*\*\* Si persiste la sospecha se debe repetir la toma de muestra y examinación de la gota gruesa cada 8 o 12 horas por un mínimo de tres días y remitir una muestra de sangre con EDTA o papel de filtro para confirmación por pruebas moleculares.



#### 9.4. SUPERVISIÓN DE LOS LABORATORIOS DE LA RNL

El LCSP realizará supervisiones anuales programadas a los laboratorios integrantes de la Red, durante el cual se evaluarán los procedimientos, insumos y equipos utilizados en el diagnóstico de malaria, además se entrevistará al personal de laboratorio, a modo de evaluar los pasos realizados, conocer las condiciones de trabajo y los inconvenientes que estos presentan, mediante la utilización de una encuesta prediseñada “Lab5” (ANEXO VI)



## CAPÍTULO 10: CONTROL DE CALIDAD

El correcto diagnóstico microscópico de la malaria es indispensable para el manejo clínico y epidemiológico del paciente, para lo cual es necesario contar con técnicas estandarizadas y controles de calidad que aseguren que el diagnóstico emitido es tan confiable como la técnica lo permita.

El control de calidad en el diagnóstico de malaria debe ser realizado en todos los procesos involucrados en las etapas pre analítica, analítica y post analítica, es decir, desde la toma de muestra hasta la emisión de resultados, con el objetivo de certificar y mantener un desempeño satisfactorio.

Los errores pueden deberse a una mala coloración, preparación de las láminas, reactivos de mala calidad o almacenamiento incorrecto de los mismos, errores durante la rotulación de las láminas o muestras, microscopios sin mantenimiento, falta de capacitación del personal, y carga laboral excesiva.

Los controles de calidad que serán realizados son: Control de calidad interno, Control de calidad externo, y el Programa de Evaluación Externa del Desarrollo (PEED). El Control de calidad externo incluye al Control Indirecto, y al Control directo de la calidad.

### 10.1. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El control interno se realiza con cada pedido de gota gruesa recibido, e involucra la evaluación de todos los procedimientos de rutina realizados para asegurar que la calidad técnica de la gota gruesa y el frotis delgado sea la adecuada.

La evaluación se realiza con el objetivo de identificar problemas y errores inmediatos, y así poder implementar medidas correctivas de forma oportuna.

En el control interno se evalúa la correcta identificación de las láminas, el tamaño y la ubicación de la gota gruesa, la calidad del frotis delgado y de la coloración de Giemsa, cada vez que ésta es realizada, controlando además la presencia de precipitado u otros artefactos, lo cual también permite determinar la calidad del buffer utilizado y si el pH de la solución es el adecuado (TABLA 12). Los resultados de esta evaluación se registran en la ficha Lab 1 (Anexo VI).

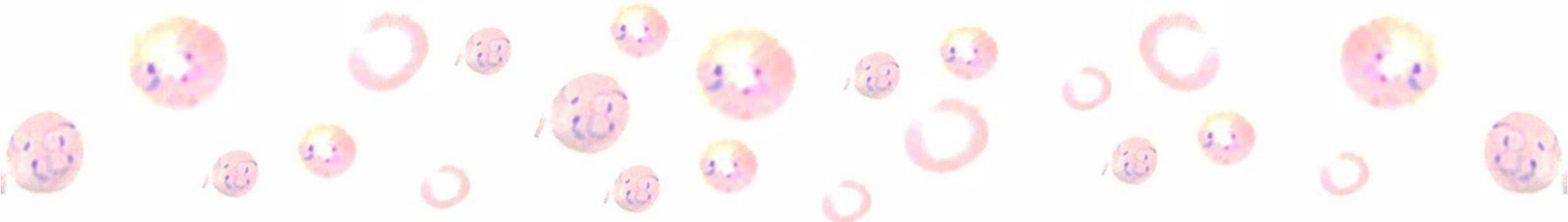


TABLA 12: Parámetros a ser evaluados durante el control interno	
PARÁMETRO	ACEPTABLE
Identificación de las muestras	Identificación legible, código o nombre del paciente.
Tamaño de la muestra	<b>Gota gruesa:</b> 1 cm de diámetro <b>Extendido fino:</b> 3 cm de largo
Ubicación de la muestra	<b>Gota gruesa:</b> a 1,5 cm del borde de la lámina <b>Extendido fino:</b> si se realizan en una misma lámina, desde el centro hasta el extremo de la lámina
Calidad de la gota gruesa	<b>Gota gruesa:</b> 10 a 20 leucocitos por campo <b>Extendido fino:</b> Con cabeza, cuerpo y cola
Deshemoglobinización	Fondo libre de glóbulos rojos
Coloración	Según tonalidad de los elementos celular (ver Cap. 4)
Presencia de precipitado	Ausencia de precipitado del colorante en toda la muestra

## I0.2. CONTROL DE CALIDAD INDIRECTO

Este control se realiza mediante el examen cruzado de las láminas observadas, para determinar la concordancia del diagnóstico microscópico realizado por los laboratorios integrantes de la RNL, e implementar las medidas correctivas que sean necesarias.

Los laboratorios de la Red deben remitir, en el primer año desde la capacitación, el 100% de las láminas, tanto positivas como negativas, para su confirmación por el LCSP, con los formularios correspondientes. Esta frecuencia se mantendrá hasta que se logren mantener resultados de control de calidad externo conforme a los estándares asignados, luego del cual se remitirá el 10% de las láminas negativas para laboratorios que presenten un flujo de muestras mayor a 30 láminas por mes, y se continuará con el envío del 100% cuando el flujo de láminas es menor a 30 láminas por mes, manteniendo en todo caso el envío del 100% de las positivas.

### **Envío de láminas**

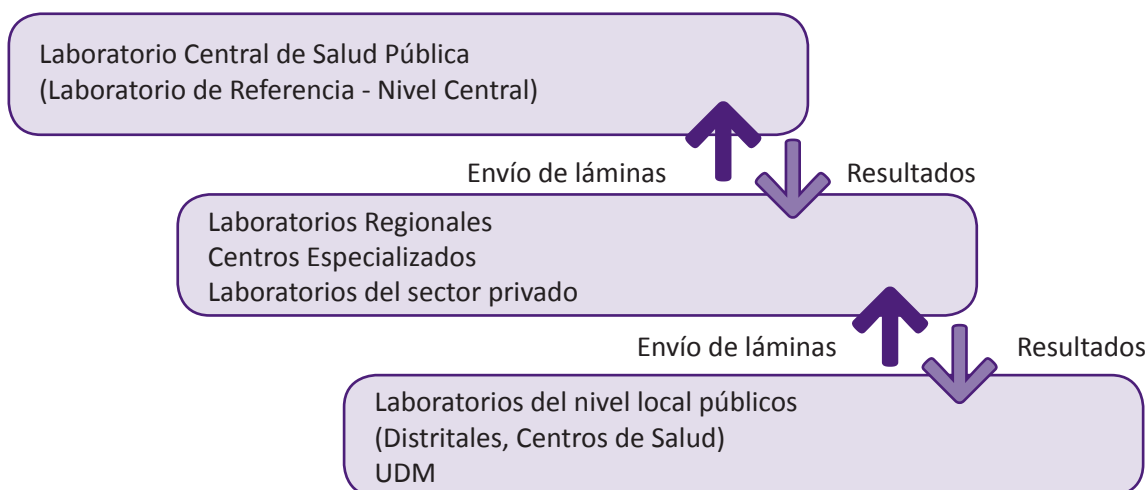
**Nivel Local:** Realizan el envío de las láminas con resultado negativo al nivel regional con frecuencia semanal y las positivas de forma inmediata, acompañadas todas por la ficha Lab1 correspondiente.

**Nivel Regional:** Responsable de analizar las láminas del nivel local y privados (en caso que hubiere), registrando todos los resultados en la ficha Lab2. Además, debe remitir de forma mensual el conglomerado de láminas con resultado negativo del nivel local y el propio, al nivel central, con la ficha Lab2 de las láminas analizadas y Lab1 de las propias. Las láminas con resultado positivo se remiten de forma inmediata al LCSP, con la ficha Lab1.

**Laboratorios del sector privado:** Remiten las láminas directamente al nivel central o al regional. La frecuencia de envío es mensual para láminas negativas, e inmediata para las láminas con resultado positivo.

**Nivel Central:** Responsable de analizar las láminas remitidas por el nivel regional y privados, realizar el análisis estadístico de las mismas, emitir y enviar los resultados de dicho análisis al nivel regional y privados. (DIAGRAMA 2).

**DIAGRAMA 2:** Envío de láminas.



### Parámetros de evaluación y resultados

Se evaluará la calidad técnica de las láminas y la concordancia de los resultados emitidos, y se registrarán los resultados en la ficha Lab2 (ANEXO VI)

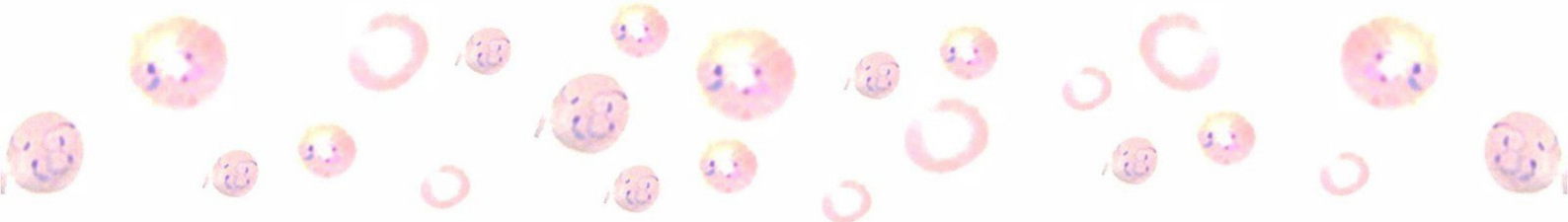
#### a. Calidad técnica de las láminas

En este indicador se controlan los mismos parámetros utilizados para el control interno (TABLA 12). Los resultados se registrarán en la ficha correspondiente, en la cual se indicará si la lámina se considera aceptable , o no aceptable , para cada indicador detallado. Tener en cuenta que el indicador "presencia de precipitado" será aceptable cuando **no** se observe precipitado en la lámina.

#### b. Concordancia de los resultados del diagnóstico

Se registrará el resultado de cada lámina según sea positiva o negativa para el laboratorio evaluado, y positiva o negativa para el laboratorio evaluador, indicando además si se trata de un falso positivo o falso negativo. Además, para las láminas positivas, se indicará la especie identificada por cada laboratorio, los estadios identificados y la estimación de la densidad parasitaria, señalando si existe discordancia entre los mismos.

El resultado de la densidad parasitaria se considera aceptable hasta un porcentaje de variación, con relación al valor obtenido por el laboratorio evaluador, por encima o por debajo del 25%.



## Análisis estadístico de resultados

El análisis estadístico será realizado por el Departamento de Gestión de Calidad del LCSP, a partir del **Registro consolidado de Control de Calidad Indirecto-Lab2** (del registro completado por el nivel regional y el central).

Debido a la escasa cantidad de pedidos de gota gruesa recibidos en ciertos laboratorios, el análisis estadístico correspondiente a cada institución será realizado a partir de los resultados obtenidos en un periodo de 4 meses, o hasta alcanzar un mínimo de 30 láminas (con dos informes al año como mínimo), para obtener así un resultado final representativo.

Los resultados obtenidos por este análisis serán registrados en la ficha Lab3, la cual será remitida al nivel regional, y éste entregará a su vez una copia de los resultados a los laboratorios evaluados de su región.

### a. Calidad técnica de la lámina

Utilizando los datos registrados en la ficha Lab2, se calcula un porcentaje de concordancia para cada parámetro, utilizando la siguiente fórmula

$$\text{Porcentaje de error} = \frac{\text{N}^\circ \text{ láminas no aprobadas} \times 100\%}{\text{N}^\circ \text{ total de láminas}}$$

### b. Concordancia de los resultados del diagnóstico

Los resultados obtenidos por el laboratorio evaluado se contrastarán con los obtenidos por el laboratorio evaluador, con relación a la detección de *Plasmodium* sp., la especie infectante, los estadios presentes y la densidad parasitaria.

- Detección de *Plasmodium* sp.: Estos resultados se clasificaran en un cuadro, según sean verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos. (TABLA 13)

**TABLA 13: Detección de *Plasmodium* sp.**

RESULTADOS DEL LABORATORIO EVALUADO	RESULTADO DEL CONTROL INDIRECTO	
	Positivo	Negativo
Positivo	Verdadero positivo (VP)	Falso positivo (FP)
Negativo	Falso negativo (FN)	Verdadero negativo (VN)





Con estos datos se calcula el porcentaje de concordancia, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de concordancia} = \frac{VP + VN \times 100\%}{VP + FP + FN + VN}$$

- Identificación de especie, estadios y densidad parasitaria: Para el cálculo de concordancia de estos indicadores, se utilizará una misma fórmula:

$$\text{Porcentaje de concordancia} = \frac{\text{Resultado aceptable} \times 100\%}{\text{N}^\circ \text{ total de láminas}}$$

El resultado final se obtiene promediando el porcentaje obtenido de cada parámetro evaluado.

Los criterios de evaluación varían según el alcance que presente cada laboratorio en el diagnóstico microscópico. Para el nivel regional y privados, se evalúan los 4 criterios: detección del parásito, identificación de especie, de estadios y la estimación de la densidad parasitaria, y para el nivel local, los dos primeros criterios.

### **Estándares de calidad**

El laboratorio evaluado deberá ser clasificado utilizando los siguientes estándares, para la calidad técnica como para la concordancia de resultados:

Excelente:	≥ 90%
Muy bueno:	80 – 89%
Bueno:	70 – 79%
En entrenamiento:	≤ 69%

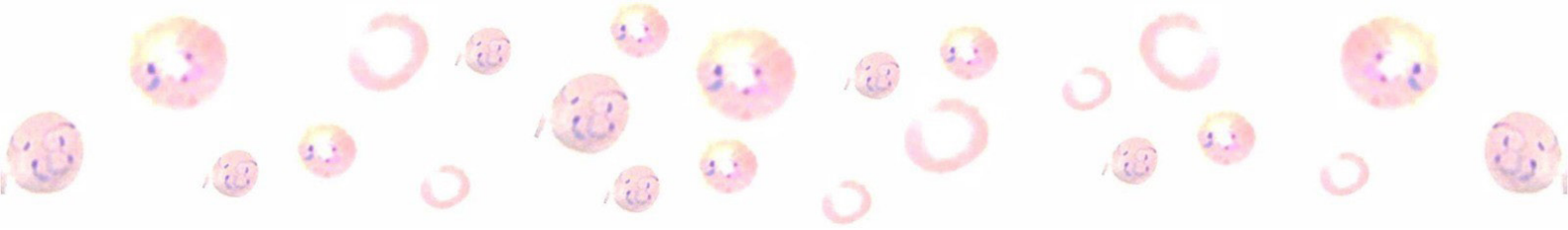
### **Medidas correctivas**

Para los resultados que no concuerden con los valores establecidos se deben realizar actividades de refuerzo según los errores detectados, como por ejemplo:

**Laminas mal preparadas** → Capacitación de refuerzo en toma de muestra y preparación de la gota gruesa y frotis delgado.

**Coloración no aceptable** → Supervisión directa, a modo de evaluar el procedimiento, el buffer utilizado, el almacenamiento del colorante, entre otros.

**Porcentaje de concordancia bajo** → Supervisión directa, a modo de conocer las condiciones de trabajo y realizar capacitaciones de refuerzo al personal.



### 10.3. CONTROL DE CALIDAD DIRECTO

Consiste en un control directo de la calidad, en el que se evalúa la capacidad diagnóstica y calidad del microscopista, sin la necesidad de calificar la calidad técnica de la lámina.

Realizado por el LCSP a los laboratorios integrantes de la RNL, mediante el envío de un panel de 10 a 20 láminas con resultado conocido, además de un cuestionario de educación continua. La frecuencia mínima del control de calidad directo es de una vez al año.

#### ***Plazo de entrega de resultados***

Laboratorio evaluado: Los resultados deben ser enviados en un plazo no mayor a los 15 días de haber recibido el panel, en la ficha Lab4. (ANEXO VI)

Laboratorio evaluador (LCSP): El informe final, registrado en la ficha Lab4, con la calificación obtenida y el certificado de participación, será enviado a cada institución dentro de los 15 días posteriores a la recepción de los resultados emitidos por el nivel evaluado.

#### ***Criterios a evaluar***

- a. Detección del parásito: Correcta identificación de láminas positivas y negativas.
- b. Identificación de especie: Se debe reconocer la especie presente en cada lámina, o especies, en caso de infecciones mixtas. En caso de que se reconozca solo una de las especies en las infecciones mixtas, se otorga la mitad del puntaje asignado para ese indicador.
- c. Identificación de estadio: Diferenciación de estadios asexuados y sexuados.
- d. Estimación de la densidad parasitaria: Un valor de parasitemia es aceptable si se encuentra dentro de un margen del 25%, con relación al valor de referencia.

Los criterios de evaluación varían según el alcance que presente cada laboratorio en el diagnóstico microscópico. Para el nivel Regional y Centros especializados, se evalúan los 4 criterios (a, b, c y d) y para el nivel Local y UDM, los dos primeros criterios (a y b).

### Análisis de los resultados

Cada lámina del control de calidad tiene asignado un total de 10 puntos. El análisis final se expresa en porcentaje, según el puntaje total obtenido. (TABLA 14).

TABLA 14: Puntaje asignado según los resultados obtenidos.		
RESULTADO	Laboratorio del Nivel Regional e Instituciones no dependientes del MSPBS	Laboratorios del nivel local
Falso negativo o positivo	0 puntos	0 puntos
Verdadero negativo	10 puntos	10 puntos
Verdadero positivo	3 puntos	5 puntos
Identificación correcta de especie	3 puntos	5 puntos
Identificación correcta de estadios	2 puntos	-
Estimación correcta de la densidad parasitaria	2 puntos	-

El resultado final se expresa en porcentaje, utilizando la siguiente fórmula:

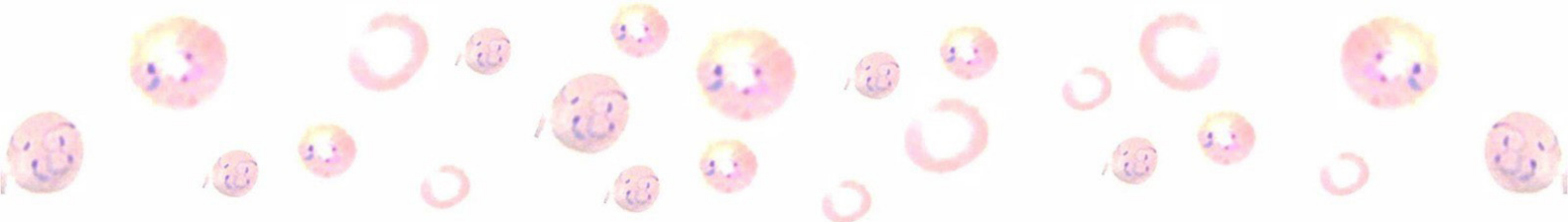
$$\text{Porcentaje de error} = \frac{\text{N}^\circ \text{ láminas no aprobadas} \times 100\%}{\text{N}^\circ \text{ total de láminas}}$$

### Estándares de calidad

Excelente:	≥ 90%
Muy bueno:	80 – 89%
Bueno:	70 – 79%
En entrenamiento:	≤ 69%

### Medidas de corrección

Si se obtienen resultados de concordancia bajo, menores al 70%, se deben realizar capacitaciones intensivas al personal del laboratorio involucrado. Para niveles del 70 al 89% también deben realizarse actividades de capacitación, reforzando en las principales debilidades encontradas en cada institución.



## I0.4. PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO (PEED)

Control de la calidad en el que se evalúa la capacidad diagnóstica y calidad del microscopista certificado.

### ***PEED a nivel central → LCSP***

El LCSP será sometido a controles anuales de calidad por el Laboratorio de Referencia Regional, mediante el envío de un panel de 20 láminas con resultado conocido.

### ***PEED a nivel regional***

Realizado por el LCSP a los laboratorios de referencia integrantes de la RNL, mediante el envío del panel de 10 láminas con resultado conocido con una frecuencia mínima de una vez al año.

Este control se realizará a los laboratorios que cuenten con un referente certificado, ya sea nacional como internacionalmente, con el fin de fortalecer la red de vigilancia del país, con estándares de calidad altos.

### ***Plazo de entrega de resultados***

Los resultados deben ser enviados en un plazo no mayor a los 15 días de haber recibido el panel, en la ficha Lab4 suministrada para tal uso. (ANEXO VI)

El informe final, con los porcentajes obtenidos y el certificado de participación, será enviado a cada institución dentro de los 15 días posteriores a la recepción de los resultados emitidos por el nivel evaluado.

### ***Criterios a evaluar***

Los criterios a evaluar serán los mismos que los empleados en el control de calidad directo: Detección del parásito, Identificación de especie, Identificación de estadio, Estimación de la densidad parasitaria.

### ***Análisis estadístico de los resultados***

Se utiliza el mismo sistema de puntuación del control directo para cada lámina, y el cálculo del porcentaje de concordancia para cada indicador se realiza utilizando la siguiente fórmula:

### ***Estándares de calidad***

Concordancia de detección del parásito:	95 - 100%
Concordancia de especie:	95 - 100%
Concordancia de estadio:	80 - 100%
Concordancia de parasitemia:	80 - 100%

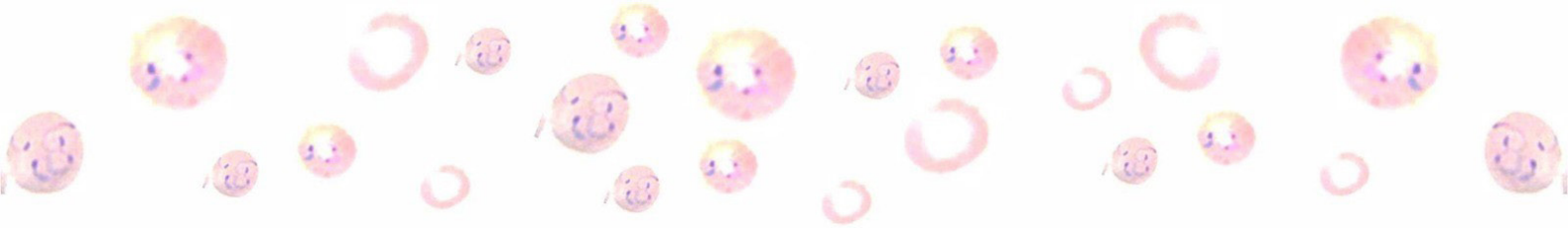
### ***Medidas de corrección***

Los laboratorios que presenten una baja concordancia recibirán un refuerzo de las competencias para el diagnóstico de malaria.

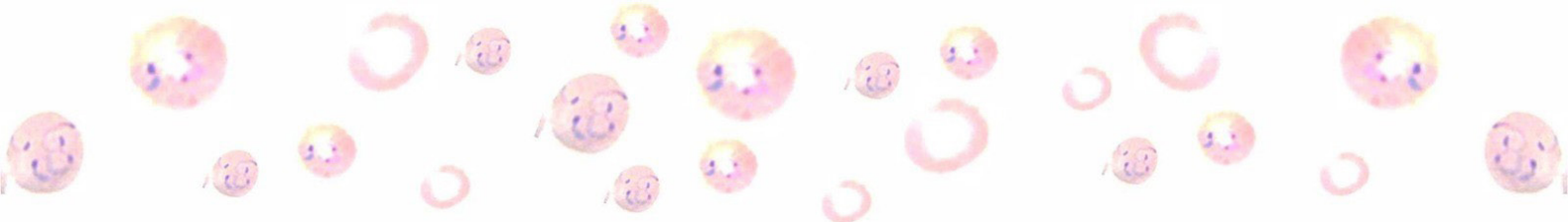


## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud. Bases del Diagnóstico Microscópico del Paludismo: Guía del alumno. 2ª ed. Ginebra : OMS, 2014.
2. Perú. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Serie de Normas Técnicas No. 39. 23a ed. Lima : INS, 2003.
3. World Health Organization. Preparation of Giemsa stock solution. Malaria Microscopy Standard Operating Procedure – MM-SOP-02. Version 1. Geneva : WHO, 2016.
4. World Health Organization. Preparation of water buffered to pH 7,2. Malaria Microscopy Standard Operating Procedure – MM-SOP-03A. Version 1. Geneva : WHO, 2016.
5. World Health Organization. Preparation of blood spots on filter paper. Malaria Microscopy Standard Operating Procedure – MM-SOP-10. Version 1. Geneva : WHO, 2016.
6. Alger J, Matute ML, Mejía RE. Manual de procedimientos operativos estándar para el diagnóstico microscópico de la malaria. Tegucigalpa: Secretaría de Salud, 2006.
7. Perú. Instituto Nacional de Salud. Norma técnica de salud para el control de calidad del diagnóstico microscópico de malaria. Lima: INS, 2010.
8. México. Instituto Nacional de Salud Pública. Manual para la vigilancia y el control del Paludismo en Mesoamérica. México. Primera edición, 2018.
9. Brasil. Ministério de Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial de malaria. Serie A: Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministerio de Saude, 2005.
10. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo. Manual de diagnóstico microscópico de la malaria. Asunción: SENEPA, 2011.
11. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo. Manual de campo para la vigilancia entomológica de *Anopheles*. Asunción: SENEPA, 2013.
12. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Servicio Nacional de Erradicación del Paludismo. Guía para el tratamiento del paludismo. Asunción: SENEPA, 2016.
13. Organización Mundial de la Salud. Uso de las pruebas en el diagnóstico rápido de la malaria. 2ª ed. Ginebra: OMS, 2006.
14. World Health Organization. Malaria microscopy. Quality assurance manual. Version 2. Geneva: WHO, 2016.
15. World Health Organization. Malaria rapid diagnostic test performance: Summary results of WHO product testing of Malaria RDTs: rounds 1-6 (2008-2015). Geneva: WHO, 2015.



16. World Health Organization. World Malaria Report 2015. Geneva: WHO, 2015.
17. World Health Organization. Global Malaria Programme. Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance. Status Report. Geneva: WHO, Abril 2016.
18. World Health Organization. Global Malaria Programme. False-negative RDT results and implications of new reports of *P. falciparum* histidin-rich protein 2/3 gene deletions. Information Note. Geneva: WHO, 2016.
19. World Health Organization. Guidelines for the treatment of Malaria. 3a Third edition. Geneva: WHO, 2015.
20. World Health Organization. Methods for surveillance of antimalarial drug efficacy. Geneva: WHO, 2009.
21. Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. Parasitología Clínica. 2a ed. Barcelona: Salvat Editores, 1986.
22. Roberts L, Janovy J. Foundations of Parasitology. 5a ed. Dubuque : Wm. C. Brown Publishers, 1996
23. Cortina A, Tobón A. Ictericia y hepatopatía en el paciente con malaria. Infectio. 2010; 14(4): 277-285.
24. Sabbatani S, Fiorino S, Manfredi R. The emerging of the fifth malaria parasite (*Plasmodium knowlesi*). A public health concern?. Braz J Infect Dis 2010; 14(3): 299-309.
25. White NJ. *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. Clinical Infectious Diseases 2008; 46:172-3.
26. Costa Rica. Ministerio de Salud. Norma de malaria. San José : Ministerio de Salud, 2015.
27. Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Federación Médica Colombiana. Bogotá: Ministerio de Salud, 2012-2013.
28. Moody A. Rapid Diagnostic tests for Malaria Parasites. Clinical Microbiology Reviews, Jan. 2002; 15(1): 66-78.
29. Colombia. Instituto Nacional de Salud. Guía para la atención clínica integral del paciente con malaria. Bogotá: INS, 2010.
30. Perlmann P, Troye-Blomberg M. Malaria and the Immune System in Humans. ChemImmunol. Basel, Karger 2002; 80: 229-242.
31. Legorreta-Herrera M, Sánchez-Cruz P. La Respuesta Inmune Celular Contra el *Plasmodium*: Agente Etiológico de la Malaria. Revista Especializada en Ciencias de la Salud 1999; 2(1/2): 3-8.
32. Pérignon Jean Louis, Druilhe Pierre. Immune mechanisms underlying the premunition against *Plasmodium falciparum* malaria. Mem. Inst. Oswaldo Cruz; 89 ( Suppl 2 ): 51-53.



33. McKenzie FE, Smith DL, O'Meara WP, Riley EM. Strain Theory of Malaria: The First 50 Years. *Adv Parasitol.* 2008; 66: 1-46.
34. Vásquez AM, Tobón A. Mecanismos de patogenia en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Biomédica* 2012; 32 (Supl.): 106-120.
35. Campuzano G, Blair S. Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico. *Medicina & Laboratorio* 2010; 16: 311-354.
36. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dirección General de Vigilancia de la Salud. Guía de investigación y respuesta ante eventos inusitados de malaria. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Paraguay. Noviembre 2016. Asunción: DGVS, MSPBS, 2016.
37. Paraguay. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dirección General de Vigilancia para la Salud. Guía de vigilancia, seguimiento y articulación técnica de estrategias para la prevención de la reintroducción de Paludismo en el Paraguay en base al Reglamento Sanitario Internacional. Asunción : DGVS, MSPBS, 2016





**ANEXOS**





## ANEXO I. Limpieza de láminas

Los portaobjetos sucios reducen la calidad de las extensiones sanguíneas y de la tinción, lo que dificulta el examen de la muestra y el diagnóstico. A pesar de que las cajas de láminas indiquen que las mismas se encuentran limpias o lavadas, éstas no pueden ser utilizadas directamente de la caja sin un lavado previo.

A continuación se detallan los pasos para la correcta limpieza, secado y empaquetamiento de las láminas portaobjetos.

### Materiales a utilizar

- Láminas de calidad superior (ideal), con borde esmerilado
- Recipiente de plástico (para el lavado con detergente)
- Detergente líquido de buena calidad
- Recipiente con tapa
- Alcohol etílico al 70%
- Esponja o paño suave
- Paño de algodón libre de pelusas
- Cajas de láminas vacías
- Hojas de papel limpias
- Cinta adhesiva
- Agua limpia
- Desechero rígido para materiales cortopunzantes (para láminas rotas)

### Procedimiento

1. Utilizar guantes en todo momento y descartar cualquier lámina que presente bordes rotos en el recipiente para materiales cortopunzantes.
2. Separar las láminas nuevas unas de otras y sumergirlas en un recipiente con detergente y agua por 4 horas o más (o durante toda la noche).
3. Limpie las láminas de ambos lados con una esponja suave.
4. Enjuague con agua dos veces hasta eliminar todo el detergente.
5. Sumergir las láminas en el recipiente o frasco con alcohol y tapar. Dejar en remojo por 30 minutos.
6. Secar completamente los portaobjetos con el paño de algodón.
7. Envolver las láminas con una hoja de papel limpia, asegurándolas con cinta adhesiva. Cada paquete debe ir rotulado, indicando que son láminas limpias, la fecha, responsable y la cantidad de láminas en cada paquete.
8. Almacenarlos en una caja de láminas y colocarlas en un lugar seco, para evitar que las mismas se peguen unas a otras y la aparición de hongos. Se recomienda colocarlas con un desecador (silica gel) si se dispone.

## ANEXO II. Preparación de Reactivos

### I. Colorante de Giemsa: Solución Madre (500mL)

#### MATERIALES A UTILIZAR

- Botella de vidrio de 500 mL. color ámbar o caramelo con tapa rosca, limpio y seco.
- Mortero de porcelana.
- Balanza analítica
- 50 a 100 perlas de vidrio de 3-5 mm de diámetro, lavadas previamente con metanol.
- 2 Probetas de 100 mL.
- Espátulas

#### REACTIVOS

- |                             |         |
|-----------------------------|---------|
| • Glicerina pura            | 250 mL. |
| • Colorante Giemsa en polvo | 3,8 g.  |
| • Alcohol metílico absoluto | 250 mL. |

Por bioseguridad se debe utilizar el equipo de protección individual (guantes, guardapolvos, gafas de protección). Los reactivos a utilizar son inflamables y volátiles, por lo tanto se recomienda la preparación del colorante en un ambiente aireado.

#### PREPARACIÓN

1. Colocar las perlas de vidrio en el frasco color ámbar.
2. Pesar en la balanza electrónica 3,8 gramos del colorante Giemsa en polvo, y colocarlo en el frasco, con las perlas de vidrio.
3. Con ayuda de la probeta, medir 250 mL. de metanol. Agregar de forma lenta 100 mL. al frasco ámbar.
4. Tapar el frasco y agitar, mediante movimientos circulares, durante 2 a 3 minutos.
5. Medir 250 mL. de glicerina pura en la segunda probeta y agregarlo al frasco.
6. Volver a agitar por 3 a 5 minutos.
7. Agregar la cantidad remanente del alcohol metílico (150 mL.) a la mezcla.
8. Tapar el frasco y continuar la agitación por 2 a 3 minutos, cerca de seis veces en el día, por 7 días como mínimo.
9. Rotular el frasco, colocando lo siguiente: Nombre del colorante, lote y marca del colorante utilizado, fecha de elaboración, fecha de vencimiento y nombre de la persona que elaboró el colorante.
10. Almacenar el colorante en un lugar seco y fresco, alejado de la luz solar directa.
11. Para su uso en el laboratorio, fraccionar en botellas pequeñas (25 a 50 mL.), con tapa rosca, cerradas firmemente.

## 2. Solución amortiguadora: Buffer fosfato ácido (PBS)

### MATERIALES A UTILIZAR

- Frasco de vidrio con tapa de 1 L, limpio y seco, de preferencia color ámbar u oscuro.
- Varilla de vidrio o palillo de madera
- Balanza electrónica
- Espátula
- pH-metro o cintas medidoras del pH
- Vaso de precipitado de 250 mL.
- Erlenmeyer o matraz de vidrio de 1 L

### REACTIVOS

- |   |         |
|---|---------|
| • Fosfato ácido disódico: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>    | 1,0 g   |
| • Fosfato de potasio diácido: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,7 g   |
| • Agua destilada o desionizada                                | 1000 mL |

### PROCEDIMIENTO

1. Pesar 0,7 gramos de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, y colocarlo en el vaso de precipitado.
  2. Agregar 150 mL de agua destilada y mezclar con la espátula hasta que la sal se disuelva por completo.
  3. Pesar 1 gramo de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, agregar a la solución anterior y mezclar.
  4. Transferir la solución al Erlenmeyer o matraz, y enazar con agua destilada hasta llegar a un volumen de 1 litro.
  5. Medir el pH del buffer y ajustar con soluciones de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 2% (para alcalinizar) y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 2% (para acidificar).
- 
- Para preparar las soluciones al 2% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, se siguen los siguientes pasos, preparando cada uno de forma individual, y almacenados en frasco separados: Pesar 2 gramos de la sal y agregar a 100 mL de agua destilada. Mezclar hasta que se disuelva completamente. La solución formada se transfiere en un frasco de vidrio y se rotula. Almacenar en un lugar fresco, alejado de la luz solar directa.
6. Traspasar la solución final al frasco con tapa, y rotular el frasco, colocando lo siguiente: Nombre del reactivo, fecha de elaboración, fecha de vencimiento y persona que elaboró el colorante. La solución preparada se debe almacenar en un lugar fresco, hasta un máximo de 7 días.

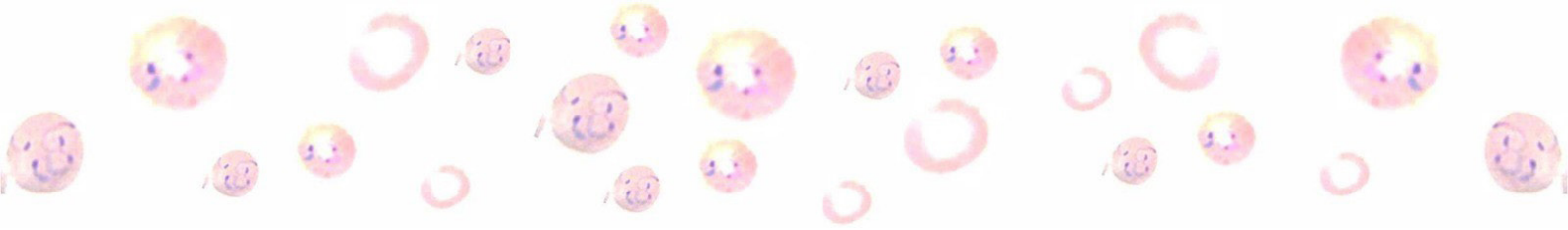
## ANEXO III. Toma de muestra de sangre venosa

### Procedimiento para la obtención de la muestra de sangre por punción venosa

La muestra de sangre venosa puede realizarse de cualquier vena visible del cuerpo, no obstante se prefieren las venas situadas en la flexura del codo o en la mano, siguiendo las normas de bioseguridad ya mencionadas (CAPÍTULO 2).

1. Registrar los datos del paciente, antes de la toma de muestra, en la ficha epidemiológica (si esta no es proveída por el paciente) y en el tubo con anticoagulante EDTA, indicando el código o nombre del paciente y la fecha de extracción.
2. Preparar el área de extracción con los materiales necesarios y colocarse los guantes de látex.
3. Ligar el brazo, para hacer más visibles las venas.
4. Una vez identificada la vena, limpiar vigorosamente el sitio de punción con una torunda de algodón embebida en alcohol al 70%, de manera de limpiar y eliminar la suciedad, el polvo y la grasa de la piel. Después de la limpieza, no volver a tocar el sitio con el dedo.
5. Punzar la vena, canalizando la aguja dentro de la luz de la misma, estirando luego suavemente el émbolo, de manera que la sangre fluya lentamente dentro de la jeringa, hasta la cantidad necesaria. Presionar el sitio de punción con una torunda de algodón por 5 minutos.
6. Colocar la cantidad de sangre necesaria, indicada en el tubo con anticoagulante y agitarlo suavemente por inversiones repetidas para disolver el anticoagulante.
7. Agitar el tubo suavemente, y con la ayuda de una pipeta, colocar dos pequeñas gotas de la sangre anti coagulada sobre el portaobjetos. La primera gota, de un tamaño similar a una cabeza de fosforo (6  $\mu$ L), en el primer tercio de la lámina para la gota gruesa. La segunda gota, un poco más pequeña que la primera (2 a 3  $\mu$ L), en el centro de la lámina para el frotis delgado. También es posible realizar el frotis delgado y la gota gruesa en láminas individuales.
8. Realizar rápidamente, antes que la sangre coagule y se seque, la gota gruesa y el frotis delgado de las gotas colocadas sobre el portaobjetos, de la siguiente manera:
  - a. **Frotis delgado:** Poner en contacto el borde de la lámina portaobjetos utilizada como extensor con la gota de sangre más pequeña ubicada en el medio de la lámina, permitiendo que la sangre se extienda a lo largo del mismo. Deslizar luego con firmeza el extensor por la superficie de la lámina manteniendo un ángulo de 45° con la superficie, cuidando de que se mantenga un contacto uniforme en todo momento.
  - b. **Gota gruesa:** Utilizando la esquina del extensor (o la punta de la pipeta), realizar varios movimientos rotatorios concéntricos (30 segundos), en una misma dirección (de adentro para afuera o viceversa), extendiendo la gota de la sangre del primer tercio, hasta que tenga un diámetro aproximado de 1 cm de diámetro. Este procedimiento es para desfibrinar la sangre.

La lámina extensora utilizada puede ser utilizada para el siguiente paciente, y una nueva lámina limpia será utilizada como extensor.



9. Dejar la lámina en una superficie plana, diferente a la mesada de trabajo, hasta que la sangre se encuentre completamente seca. Cubrir las láminas confeccionadas durante el proceso de secado para evitar la contaminación con polvo y la acción de insectos sobre los frotis. Para acelerar el secado se puede utilizar calor suave, como el calor generado por un foco incandescente o una estufa a 37 °C. Demasiado calor, puede producir la autofijación de la gota gruesa e interferir así en la deshemoglobinización.
  
10. Una vez que el frotis se encuentre completamente seco, colocar la lámina en el portaláminas.



## ANEXO IV. Toma de muestra en papel de filtro

La muestra en papel de filtro es utilizada para la realización de pruebas de biología molecular, la cual resulta especialmente útil en el diagnóstico de las infecciones mixtas y las asintomáticas.

### INSUMOS Y REACTIVOS

- Papel de filtro (con la calidad necesaria para análisis genotípicos).
- Bolsas de plástico con cierre hermético
- Sangre entera o con anticoagulante
- Pipeta automática y puntas.

### PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA EN PAPEL DE FILTRO

1. Registrar los datos del paciente en el papel de filtro, indicando el nombre del paciente y la fecha de toma de muestra.
2. Con ayuda de una pipeta, colocar 40 a 50  $\mu\text{L}$  de sangre, y colocarlos en el área del papel de filtro designada, preparando entre dos a tres círculos de muestra por paciente.
3. Dejar secar la muestra a temperatura ambiente y almacenar luego en una bolsa pequeña de plástico con cierre hermético. Se recomienda el uso de desecante.
4. Remitir la muestra al laboratorio de referencia nacional en la brevedad posible.





## ANEXO V. Cuidado, limpieza y mantenimiento del microscopio

A continuación se detallan las recomendaciones para el correcto manejo del microscopio:

- El microscopio debe estar ubicado en una superficie lisa y nivelada, protegido del contacto directo del sol.
- Cuando no se utilice el microscopio se debe mantener al mismo cubierto con una funda de tela o plástico, para protegerlo del polvo, y desenchufado.
- Para evitar la proliferación de hongos, conservar el equipo en un área seca. En lo posible con aire acondicionado, que funcionen durante todo el día.
- Limpiar el objetivo de inmersión diariamente, para eliminar el aceite remanente, utilizando un papel seco especial para los mismos, o un paño de tela fina. No utilizar alcohol.
- Limpiar las lentes con un cepillo de cerdas finas y suaves, preferentemente pelo de camello.
- No desmontar el microscopio.
- Evitar el transporte constante del equipo. Si se necesita trasladarlo, el mismo debe estar bien fijo dentro de su empaque original, o en una caja que contenga materiales capaces de amortiguar golpes o vibraciones excesivas (como espuma de poliuretano).
- Documentar los problemas o fallas encontradas durante la utilización del microscopio, y las fechas de los mantenimientos realizados.
- El equipo debe recibir asistencia técnica especializada cada 6 meses. Durante el mantenimiento del microscopio se debe verificar el ajuste de la plataforma mecánica y del mecanismo de enfoque, el funcionamiento del diafragma y el alineamiento óptico. Además se debe limpiar el equipo y lubricarlo según las indicaciones del fabricante.

# ANEXO VI. Fichas de uso en el laboratorio

## I. Ficha SFA: Vigilancia del Síndrome Febril Agudo



MINISTERIO DE  
SALUD PÚBLICA  
Y BIENESTAR SOCIAL



### VIGILANCIA DE SÍNDROME FEBRIL AGUDO

N°.....

**Definición de caso:** Persona de cualquier edad y sexo que presenta **FIEBRE** de menos de siete (7) días de duración sin foco aparente.

**SOSPECHA CLÍNICA EPIDEMIOLÓGICA** Marcar un solo diagnóstico

1. B5.4 Paludismo ( ) 2. A90 Dengue ( ) 3. A95.9 Fiebre Amarilla ( ) 4. A27.9 Leptospirosis ( ) 5. A98.5 Hantavirus ( ) 6. A92.0 Chikungunya ( ) 7. A92.8 Zika ( )

#### DATOS DEL NOTIFICANTE:

8. Institución: ..... 9. Nombre del Notificante: .....

10. N° de Historia Clínica: ..... 11. Fecha de notificación: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### DATOS DEL PACIENTE

12. Nombres y Apellidos: ..... 13. CI: .....

14. Edad: ..... 15. Sexo: M ( ) F ( ) 16. Domicilio: .....

17. Teléfono: ..... 18. Departamento: ..... 19. Distrito: .....

20. Localidad/Barrio: ..... 21. Urbano ( ) Rural ( )

22. En caso de niños/as o adultos/as en situación de discapacidad favor registrar el nombre del tutor: .....

#### DIBUJAR EL CROQUIS PARA UBICAR LA VIVIENDA



#### DATOS CLÍNICOS

**FIEBRE** 23. Fecha de inicio: ...../...../..... 24. Cuenta con alguna prueba de laboratorio positiva? IgM ( ) NS1 ( ) Ninguna ( )

25. Ambulatorio ( ) 26. Fecha de la consulta: ...../...../..... 27. Hospitalizado ( ) 28. Fecha de hospitalización: ...../...../.....

29. UCI Si ( ) No ( ) 30. Fecha de Ingreso a UCI: ...../...../.....

31. Fecha de toma de muestra: ...../...../.....

SÍNTOMAS	(1) Si	(6) No	(999) Ign	SÍNTOMAS	(1) Si	(6) No	(999) Ign	SIGNOS	(1) Si	(6) No	(999) Ign
32. Cefalea				43. Oligoanuria				49. Exantema			
33. Mialgias				44. Epistaxis				50. Shock			
34. Artralgias				45. Gingivorragia				51. Inyección conjuntival			
35. Dolor retro-ocular				46. Hemoptisis				52. Edema bpalpebral			
36. Prurito				47. Melena				53. Conjuntivitis			
37. Náuseas				48. Vómitos negros				54. Taquipnea			
38. Vómitos								55. Hepatomegalia			
39. Dolor abdominal continuo								56. Esplenomegalia			
40. Dolor abdominal intermitente								57. Alteración del sensorio			
41. Tos								58. Rigidez de nuca			
42. Disnea								59. Artritis			
								60. Petequias			
								61. Púrpura			
								62. Ictericia			
Otros: .....											

Presión Arterial: 63. MIN: ..... 64. MAX: ..... 65. Pulso: ...../min. 66. FR: ...../min. 67. Prueba de lazo: POS ( ) NEG ( )

#### DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

68. En el hogar del paciente ¿quién es el jefe/a del hogar?

(aclarar al entrevistado que "jefe/a del hogar" es aquella persona considerada como tal por los demás miembros del hogar, ya sea por su edad, por ser el principal sostén económico o moral o por cualquier otro motivo)

Marcar una sola opción: El/la paciente ( ) Cónyuge ( ) Padre o madre ( ) Otro ( ) No sabe/No Contesta ( )

69. ¿Cuál es el último nivel de estudio que completó el jefe/a del hogar?

Marcar una sola opción: Ninguno ( ) Primaria o Enseñanza Escolar Básica ( ) Secundaria o Enseñanza Media ( ) Superior No Universitario ( ) Superior Universitario ( ) No sabe/No Contesta ( )

70. Ocupación: ..... 71. Lugar (Localidad): ..... 72. Rural ( ) Urbano ( )

73. Viajó durante los últimos 30 días? SI ( ) NO ( ) 74. Fecha: ...../...../..... 75. Lugar (Localidad): .....

76. Estuvo en el campo, monte? SI ( ) NO ( ) 77. Fecha: ...../...../..... 78. Lugar (Localidad): .....

79. Tuvo un cuadro similar anterior? SI ( ) NO ( ) 80. Fecha: ...../...../..... 81. Diagnóstico del cuadro anterior:

Paludismo ( ) Dengue ( ) Fiebre Amarilla ( ) Leptospirosis ( ) Hantavirus ( ) 82. Otros: .....

83. Hay casos similares actualmente en su entorno? SI ( ) NO ( ) Ignora ( ) 84. Vecindario ( ) Trabajo ( )


85. Riesgo Social: Vive solo ( ) Vive en área de difícil acceso a un centro hospitalar ( ) Pobreza ( )

86. Condiciones co-existentes: Embarazo ( ) Diabetes ( ) Inmunocompromiso ( ) 87. Otros: .....

88. Vacuna antimarilica: SI ( ) NO ( ) Ignora ( ) 89. Fecha de vacunación: ...../...../.....


UGD 04-2014

## 2. Ficha Lab1: Para el manejo del paciente en el laboratorio, la cual debe ir adosada a la ficha epidemiológica.



LABORATORIO CENTRAL DE SALUD PÚBLICA  
Asunción - Paraguay

REPÚBLICA DEL PARAGUAY  
**Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social**  
Laboratorio Central de Salud Pública  
**DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE MALARIA**  
FICHA Lab1



Fecha de toma de muestra: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fecha del envío: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Responsable de la remisión: \_\_\_\_\_ Servicio de Salud/Hospital: \_\_\_\_\_

**DATOS DEL PACIENTE**

Nombre y Apellido: \_\_\_\_\_ Cod. de Entrada: \_\_\_\_\_

Género: F  M  Edad: \_\_\_ años

Muestra: \_\_\_\_\_

**RESULTADO**

**1. Microscopía:**  
 Negativo   
 Positivo  **Especie:** *P. falciparum*  *P. vivax*  Mixta  Otro: \_\_\_\_\_  
 Densidad parasitaria: \_\_\_\_\_

**2. Tiras rápidas:**  
 Negativo   
 Positivo  HRP II (P.f.)  Pan- LDH

**3. Otra técnica:** \_\_\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_

RESPONSABLE DEL DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_  
 FECHA DE DIAGNÓSTICO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Calidad técnica de la muestra															
Gota gruesa				Extendido fino						Coloración					
Tamaño		Ubicación		Tamaño		Ubicación		Calidad		Deshemoglob.		Tonalidad		Ppdo.	
A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA

\*A= Aceptable; NA= No Aceptable

**SEGUIMIENTO DEL PACIENTE: Control del tratamiento**

Médico encargado del tratamiento: \_\_\_\_\_

Control	Fecha	Resultado	Densidad parasitaria	Responsable
1				
2				
3				
4				
5				

**OBSERVACIONES**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_


### 3. Planilla consolidada de resultado laboratorio de malaria:

En esta planilla se registrarán los resultados de todas las muestras observadas en el día, para luego ser remitida al CNE y al LCSP.

PLANILLA CONSOLIDADA DE RESULTADO LABORATORIAL DE MALARIA											
ESTABLECIMIENTO DE SALUD:		Fecha de notificación:									
REGION SANITARIA:											
A través de la presente pongo a su conocimiento y de las autoridades pertinentes el resultado del análisis microscópico de Gota Gruesa para el diagnóstico de Malaria.											
<b>INFORME DE RESULTADOS</b>											
N°	Nombre y Apellido	Código de entrada	Edad	Ciudad	FECHA		Procedencia de la muestra remitida	Servicio	Resultado	Especie	Densidad Parasitaria
					Toma de muestra	Recepción al laboratorio					
1											
2											
3											
OBSERVACIONES:											
<p style="text-align: right;"><b>Firma y Sello</b></p> <p><b>Fecha recepción al laboratorio:</b> En casos de muestras remitidas, indicar la fecha en día, mes y año (dd/mm/aaaa), de recepción de las mismas en el laboratorio.</p> <p><b>Fecha de diagnóstico:</b> Anotar la fecha en la que se obtuvo el resultado del análisis, en día, mes y año (dd/mm/aaaa) la muestra.</p> <p><b>Servicio:</b> Indicar si el paciente es ambulatorio o hospitalizado.</p> <p><b>Resultado:</b> Indicar si se obtuvo un resultado Positivo o negativo.</p> <p><b>Especie:</b> <i>Plasmodium falciparum</i>, <i>P. vivax</i>, <i>P. ovale</i>, <i>P. malariae</i>.</p> <p><b>Densidad parasitaria:</b> Informar según valor de eas/uL (estado asexuado sanguíneo por microlitro) y/o ess (estado sexuado sanguíneo por microlitro).</p> <p><b>Firma y Sello:</b> Registrar la firma y aclaración del responsable.</p>											



## 5. Ficha Lab3: Informe del resultado final del control de calidad indirecto



REPÚBLICA DEL PARAGUAY  
Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social  
Laboratorio Central de Salud Pública

**PLANILLA DE RESULTADOS - CONTROL DE CALIDAD INDIRECTO EN EL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE MALARIA**  
**FICHA Lab3**

Período evaluado: \_\_\_\_\_

Institución/Laboratorio Evaluado: \_\_\_\_\_

Región Sanitaria: \_\_\_\_\_

Institución/Laboratorio Evaluador: \_\_\_\_\_

Evaluador: \_\_\_\_\_

LÁMINAS REMITIDAS				LÁMINAS ANALIZADAS								
Total de láminas recibidas	Negativas			Total de láminas revisadas	% revisado	FALSO POSITIVO	FALSO NEGATIVO	% CONCORDANCIA				
	P.f	P.v	P.m					P.o	Mixta	Detección	Especi e	Estadio s

\*P.f= P. falciparum; P.v= P. vivax; P.o= P.ovale; P.m= P. malariae

**CALIDAD TÉCNICA DE LA MUESTRA:**

1. Preparación de la gota gruesa
  - Tamaño: \_\_\_\_\_
  - Ubicación: \_\_\_\_\_
  - Calidad: \_\_\_\_\_
2. Preparación del Frotis
  - Tamaño: \_\_\_\_\_
  - Ubicación: \_\_\_\_\_
  - Extensión: \_\_\_\_\_
3. Coloración
  - Deshemoglobinización: \_\_\_\_\_
  - Tonalidad: \_\_\_\_\_
  - Precipitado: \_\_\_\_\_

**CONCORDANCIA DE RESULTADOS:**

1. Porcentaje final obtenido: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del Responsable del Control de calidad

## 6. Ficha Lab4: Registro de resultados del control de calidad directo y el PEED, según corresponda.



REPÚBLICA DEL PARAGUAY  
Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social  
Laboratorio Central de Salud Pública



### CONTROL DE CALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE MALARIA FICHA Lab4

TIPO DE CONTROL DE CALIDAD REALIZADO: \_\_\_\_\_

Institución/Laboratorio Evaluado: \_\_\_\_\_ Región Sanitaria: \_\_\_\_\_

Personal encargado de realizar el Control: \_\_\_\_\_

Fecha de recepción de láminas: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fecha de envío de resultados: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nro.	Laboratorio Evaluado					LCSP	
	Cód. lámina	Resultado		Especie	Densidad parasitaria		Puntaje obtenido
		Negativo	Positivo		Asexuado	Sexuado	
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
<b>Puntaje total obtenido:</b>							
<b>PORCENTAJE OBTENIDO</b>							

\*P.f= *P. falciparum*; P.v= *P. vivax*; P.o= *P. ovale*; P.m= *P. malariae*

Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_


\_\_\_\_\_

-


\_\_\_\_\_  
Firma del Responsable –  
Laboratorio Evaluado

\_\_\_\_\_  
Firma del Responsable –  
Laboratorio evaluador

## 7. Ficha Lab5: Encuesta a realizar durante la supervisión directa a los laboratorios integrantes de la red.



REPÚBLICA DEL PARAGUAY  
**Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social**  
 Laboratorio Central de Salud Pública



### SUPERVISIÓN DIRECTA – DIAGNÓSTICO DE MALARIA

#### FICHA Lab5

Fecha: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Responsable de la supervisión: \_\_\_\_\_

Servicio de Salud/Hospital: \_\_\_\_\_ Jefe del laboratorio: \_\_\_\_\_

Responsable del diagnóstico de malaria: \_\_\_\_\_ Capacitado: Si  No

Fecha de la última capacitación: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### ENCUESTA

Bioquímico encuestado: \_\_\_\_\_ Cargo: \_\_\_\_\_

Infraestructura			
Iluminación	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Espacio físico	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Orden y aseo	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Ubicación del laboratorio	Intrahospitalario <input type="checkbox"/>	Extrahospitalario <input type="checkbox"/>	
Personal			
Personal que trabaja en el laboratorio	Bioquímicos:	Técnicos:	Administrativos:
Reactivos			
Disponibilidad de reactivos e insumos	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Almacenamiento de reactivos	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Registro de temperatura de refrigeradores	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Obs.:
Equipos			
Cantidad de microscopios:			
Mantenimiento del microscopio	Si <input type="checkbox"/>	Fecha:	No <input type="checkbox"/>
Utilización del equipo	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Procedimientos operativos			
Toma de muestra	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Coloración	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Plazo de entrega de resultados	Adecuado <input type="checkbox"/>	Inadecuado <input type="checkbox"/>	Obs.:
Conoce el flujo de notificación ante un caso sospechoso de malaria?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Obs.:
Recibió en su servicio algún casos sospechoso de malaria en los últimos 6 meses?	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Obs.:
	Cuántos? :		
Control de calidad			
Realiza control de calidad interno	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Obs.:
Recibe resultados del control de calidad	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Obs.:

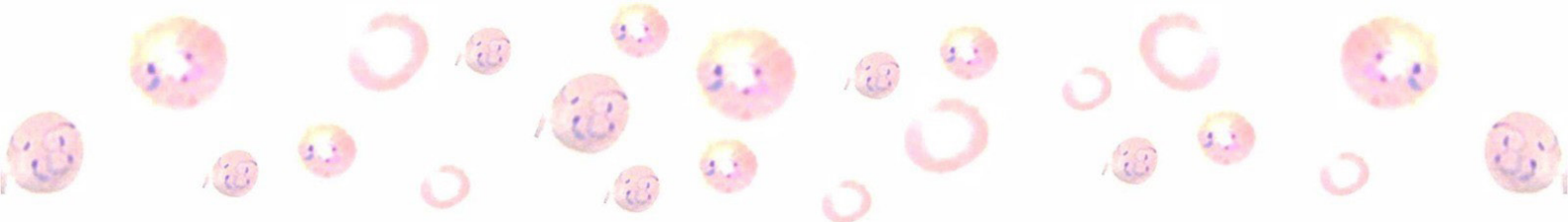


## ANEXO VII. Imágenes

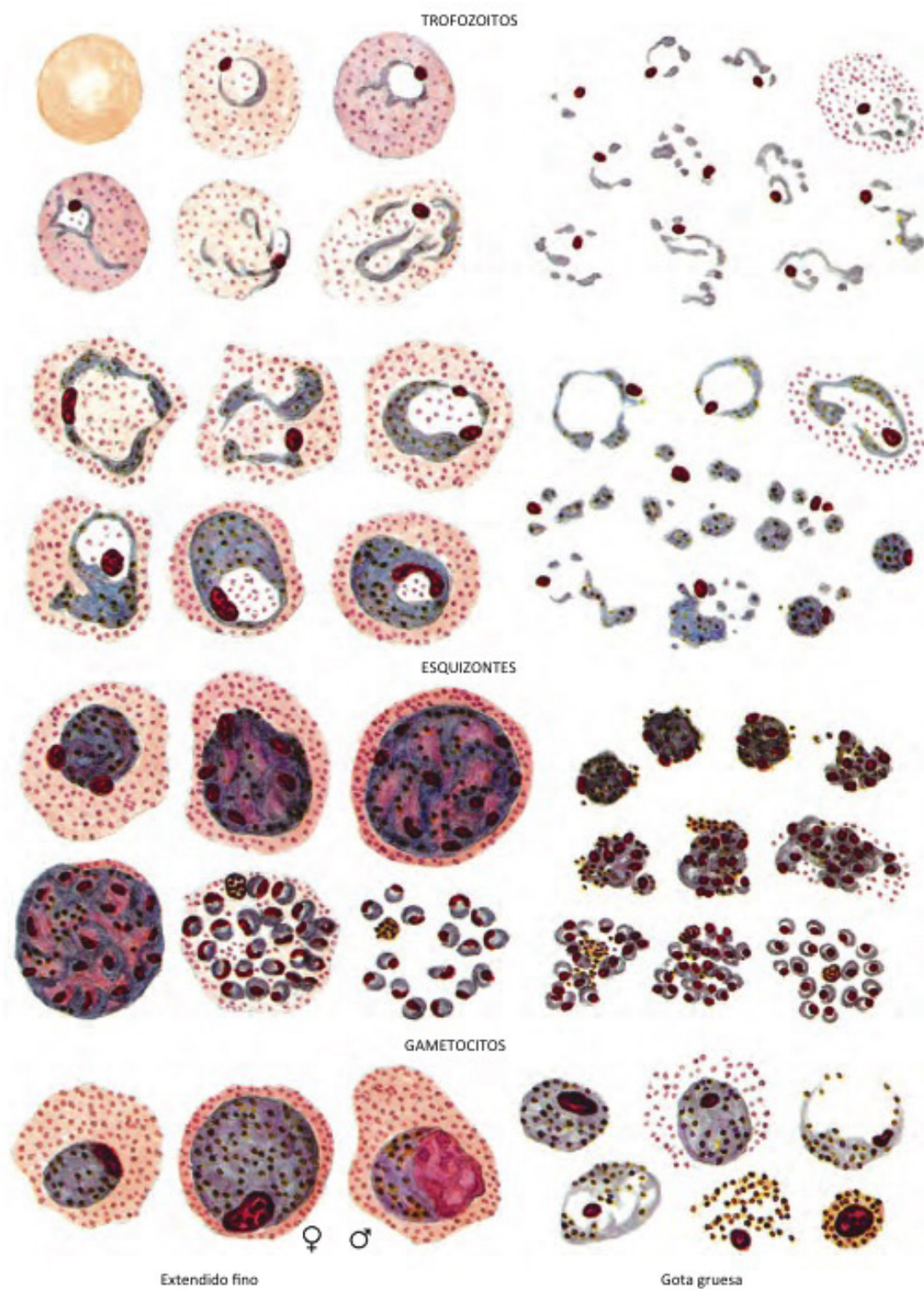
### I. Diferentes estadios de *Plasmodium falciparum*, teñidos con Giemsa



Fuente: OMS

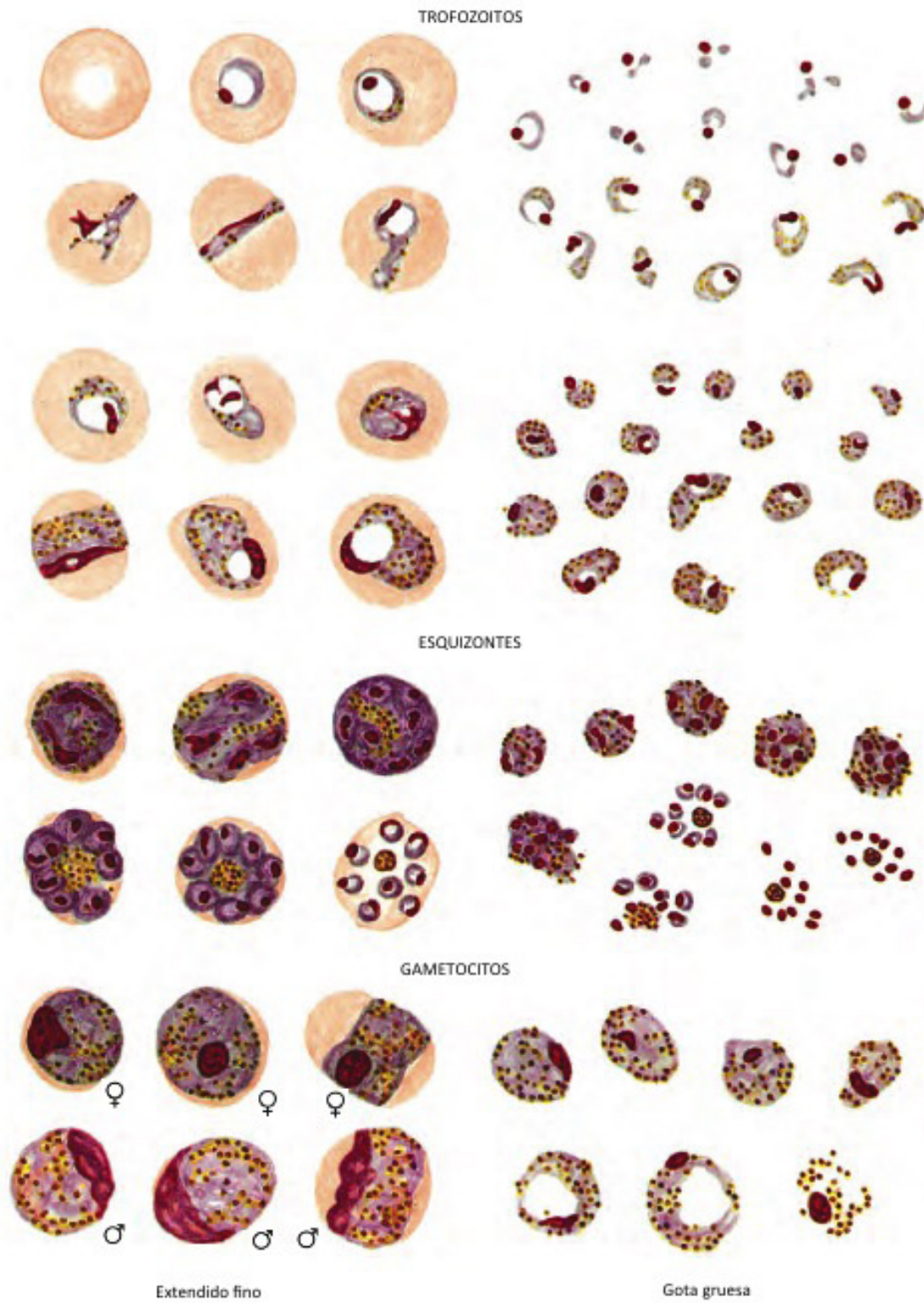


## 2. Diferentes estadios de *Plasmodium vivax*, teñidos con Giemsa

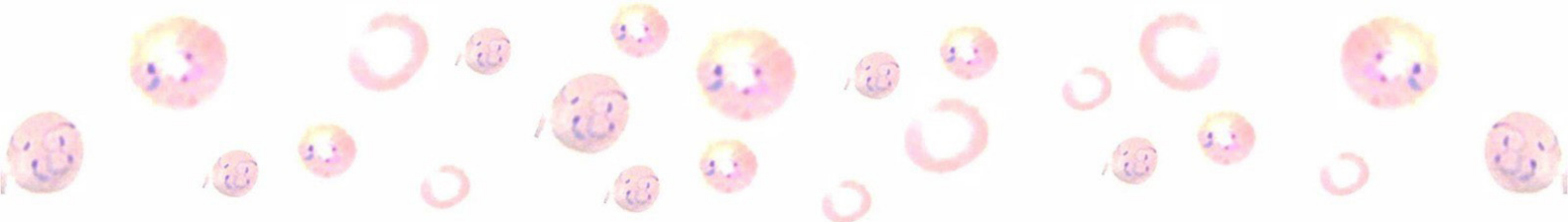


Fuente: OMS

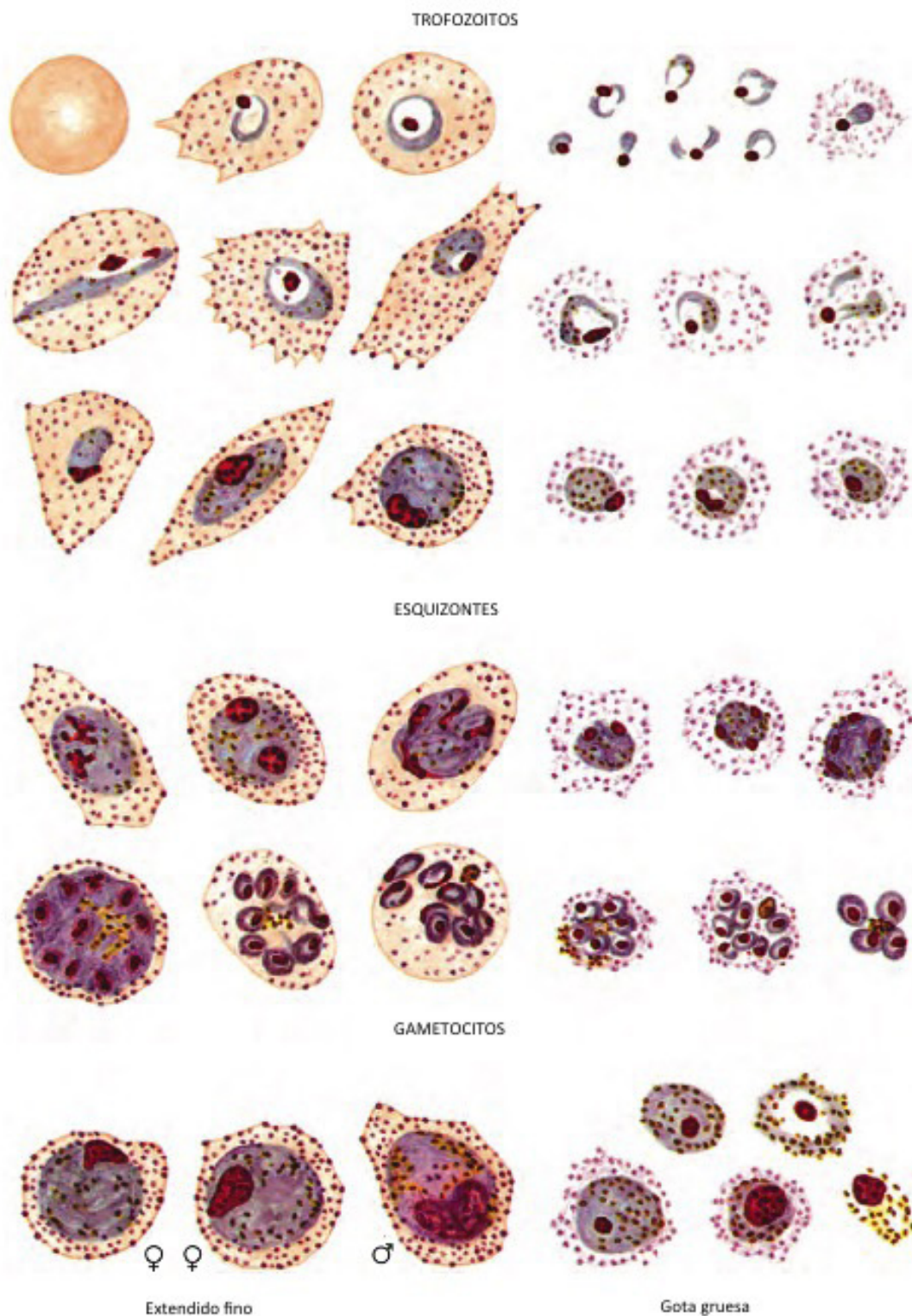
### 3. Diferentes estadios de *Plasmodium malariae*, teñidos con Giemsa



Fuente: OMS



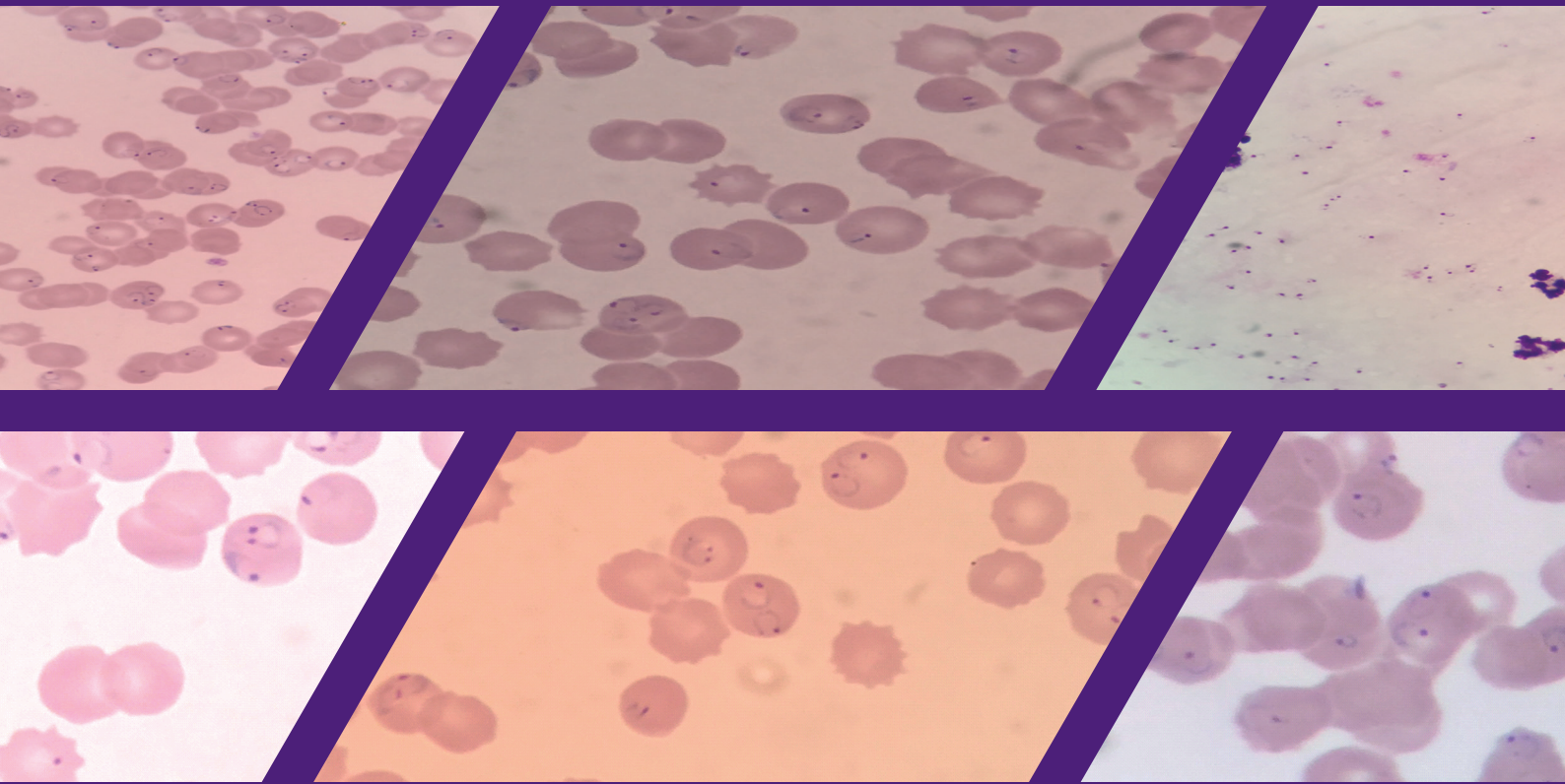
### 3. Diferentes estadios de *Plasmodium ovale*, teñidos con Giemsa





Impreso en el mes de Mayo de 2017  
en los Talleres de Arami Grupo Empresarial  
Asunción - Paraguay  
Mercosur





Organización Internacional para las Migraciones (OIM)  
El Organismo de las Naciones Unidas para la Migración

ISBN: 978-99967-36-41-4



9 789996 736414