

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria que tiene una distribución amplia en las regiones tropicales y constituye uno de los principales problemas de Salud Pública en el mundo debido a su alta morbilidad, mortalidad e impacto socioeconómico, ya que por siglos ha representado una amenaza para la salud del hombre y la economía de los países endémicos en vía de desarrollo.

Es causada por un protozooario perteneciente al género *Plasmodium*, siendo cuatro las especies que pueden parasitar al hombre: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*, en nuestro país se han descrito las tres primeras. La malaria es transmitida a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* infectado. El ciclo de vida del parásito es muy complejo e involucra una fase de multiplicación sexuada en el vector (hospedador definitivo) y otra asexual en el humano (hospedador intermediario).

La Organización Mundial de la Salud estima que anualmente ocurren más de 300 millones de casos de malaria y que 1,5 a 2,5 millones de personas fallecen como consecuencia de esta enfermedad, a cada minuto de 3 a 5 niños mueren de malaria.

En nuestro país, actualmente la malaria vuelve a ser una amenaza debido al incremento de casos en los estados Bolívar, Amazonas, Sucre y Delta Amacuro, ya que esta epidemia está asociada con factores como los cambios de clima, la resistencia de los parásitos a los medicamentos, proyectos de deforestación, agrícolas, colonización, minería, industria maderera y otros que afectan a los constantes flujos migratorios y la dinámica poblacional que traen como consecuencia migraciones en las cuales la población no está debidamente protegida y donde se producen condiciones favorables para la transmisión de la malaria.

El área malárica en Venezuela está conformada por tres focos: el **foco meridional**, que comprende los estados Bolívar, Amazonas, parte oriental de Apure y Delta Amacuro; **foco occidental**, formado por los estados Táchira, Zulia, Barinas, Trujillo, Mérida, parte occidental de Apure, Yaracuy y Portuguesa y el **foco oriental** que comprende los estados Sucre, Anzoátegui, Monagas y la parte occidental de Delta Amacuro, siendo las especies vectoras principales de los focos maláricos: *Anopheles darlingi*, *A. nuñez-tovari* y *A. aquasalis* respectivamente.

Este manual tiene como principal objetivo actualizar y capacitar personal del sector salud, proporcionando conceptos teóricos-prácticos y las herramientas básicas referentes a la técnica más usada en el diagnóstico parasitológico de la malaria: **extendido sanguíneo** y **gota gruesa**, para garantizar la uniformidad, optimización y veracidad en el diagnóstico.

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LA MALARIA

En el diagnóstico de la malaria la detección precoz a través de la observación directa de los parásitos maláricos en muestras sanguíneas coloreadas con Giemsa, es fundamental para tomar medidas rápidas y eficaces que conlleven a la reducción de la morbilidad y mortalidad por la enfermedad, sobre todo en las áreas endémicas.

Es necesario investigar de manera continua los nuevos métodos de diagnóstico que se desarrollan y compararlos con los métodos tradicionales: gota gruesa y extendido sanguíneo, que siguen siendo las pruebas de referencia, con el fin de evaluar la factibilidad y aplicabilidad en los estudios epidemiológicos y programas de control existentes.

El diagnóstico de la malaria se fundamenta en los antecedentes epidemiológicos y cuadro clínico que presenta el paciente, pero debe ser confirmada la presencia de parásitos en la muestra sanguínea, a través del laboratorio.

El diagnóstico parasitológico de la malaria se basa en la demostración de los parásitos en la muestra sanguínea. Este método de diagnóstico directo, utilizando extendidos fue introducido por Alfonso Laveran en el año 1880, desde que descubrió los parásitos maláricos. Luego se fue modificando esta técnica y se logró concentrar mayor cantidad con el método de la gota gruesa.

Con la introducción de los colorantes biológicos basados en el azul de metileno con el cual se lograba el “Efecto Romanowsky” que consiste en la coloración diferencial del núcleo y citoplasma, se logró la perfección del examen sanguíneo para el diagnóstico de los parásitos. Con este método se pueden detectar parasitemias hasta de 0,001%, además la especie, estadio de desarrollo, densidad parasitaria y tiene gran aplicación en el medio rural ya que no requiere de material especial para su ejecución; sin embargo presenta la desventaja de que para estudios en masa se requiere mayor consumo de tiempo y un personal debidamente entrenado.

El diagnóstico parasitológico de la malaria consiste en la observación microscópica de gota gruesa y extendido preparado en el mismo porta-objeto. En la gota gruesa se detecta si hay o no parásitos maláricos, en el extendido se hace el diagnóstico de especie.

El examen de rutina de la gota gruesa requiere observar 100 campos microscópicos a un aumento final de 1000X (ocular 10X y objetivo de 100X). Una lámina puede diagnosticarse como negativa, solo después de observar 100 campos microscópicos sin haber encontrado parásitos; en el caso de positividad se debe examinar los 100 campos para asegurar detectar la posibilidad de infección mixta, es decir, más de una especie en la muestra sanguínea.

El examen del extendido de sangre, requiere mayor tiempo de observación en comparación con la gota gruesa, ya que la concentración de los elementos sanguíneos es menor y para determinar si la muestra es positiva o negativa hay que observar 300 campos microscópicos; en caso de duda deberán examinarse de 400 a 500 campos.

MALARIA

La malaria o paludismo es una enfermedad causada por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida al hombre por la picadura de mosquitos hembras del género *Anopheles* infectados. Existen más de 150 especies de *Plasmodium* que infectan diferentes vertebrados, pero solo cuatro especies causan malaria humana: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*; en Venezuela se han descrito las tres primeras.

MODO DE TRANSMISIÓN

La malaria es transmitida por la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*, también puede transmitirse por transfusión de sangre de personas infectadas, por el empleo de agujas y jeringas contaminadas o por transmisión congénita.

RESERVORIO

El hombre es el único reservorio importante del paludismo humano.

CICLO BIOLÓGICO

Los parásitos del género *Plasmodium* se desarrollan en dos huéspedes y en cada uno de ellos tienen un ciclo reproductivo diferente; en el *Anopheles*, huésped definitivo, se cumple una fase sexual o esporogónica del ciclo de vida del parásito, mientras que en el hombre, huésped intermediario, tiene lugar la fase asexual o esquizogónica.

CICLO ESPOROGÓNICO

Cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* pica a una persona parasitada, ingiere todas las formas del parásito presentes en la sangre. Las formas asexuales son digeridas en el estómago del mosquito, mientras que los gametocitos (masculino y femenino) experimentan la exflagelación y la maduración respectivamente.

Los gametocitos salen del glóbulo rojo, el macho emite los microgametos (ocho), y la hembra sufre procesos de maduración transformándose en macrogameto. Con la fecundación del macro por el microgameto se origina el huevo o cigote, el cual continúa su crecimiento transformándose en ooquinetos u oocinetos (huevo móvil), atraviesa la pared del estómago del mosquito y se enquistan denominándose ooquistes y siguiendo su proceso de desarrollo, maduran y liberan miles de esporozoitos, cuerpos fusiformes con un núcleo central y 13 μ de largo por 2 de diámetro, que se diseminan por la hemolinfa del insecto, y emigran hacia las glándulas salivales.

En este momento el mosquito se convierte en infectante, capaz de transmitir la malaria. La duración de este ciclo depende de la especie parasitaria, especie del mosquito, de la temperatura ambiental, la humedad relativa y la altura. Ej.: A 25 ° C, la esporogonia tiene una duración para el *Plasmodium vivax* de 8 a 10 días, *Plasmodium falciparum* de 12 a 14 y *P. malariae* de 25 a 28 días. Los *Anopheles* tienen un promedio de vida de 1 a 2 meses aproximadamente.

CICLO EXOERITROCÍTICO

Se realiza en el hombre y empieza cuando la hembra de un mosquito del género *Anopheles* infectado pica a una persona sana e inyecta los esporozoitos (forma infectante para el hombre), los cuales permanecen aproximadamente 30 minutos en circulación, luego pasan al hígado e invaden las células hepáticas donde empiezan a crecer y a dividirse transformándose en esquizonte hepático o exoeritrocítico. Una vez maduro el esquizonte, se rompe, liberando aproximadamente 10.000 merozoitos en *P. vivax*, 40.000 en *P. falciparum* y 12.000 en *P. malariae*, los cuales van a invadir los glóbulos rojos.

Este ciclo exoeritrocítico tiene una duración de 8 días para *P. vivax*; 5.5 para *P. falciparum* y 14 para *P. malariae*.

En las infecciones por *Plasmodium vivax*, una población de esporozoitos al entrar a los hepatocitos se diferencian en hipnozoitos los cuales permanecen en estado de latencia por semanas, meses o años. Después de un período de tiempo, los hipnozoitos se activan y producen una esquizogonia exoeritrocítica, dando lugar a una onda de merozoitos que invaden la sangre produciendo una recaída.

CICLO ERITROCÍTICO

Consiste en la invasión, crecimiento y multiplicación asexual del parásito en el interior de los glóbulos rojos.

En este ciclo, el parásito pasa por las formas de trofozoito joven, mediano, adulto, esquizonte presegmentado y esquizonte segmentado o maduro.

Al romperse el esquizonte maduro, libera los merozoitos (momento en que se produce el acceso febril); unos merozoitos van a invadir nuevos glóbulos rojos para repetir el ciclo y otros van a dar origen a los gametocitos. Los microgametocitos y macrogametocitos son la forma infectante para el mosquito y epidemiológicamente importantes, pues son los responsables de la transmisión de la malaria.

El ciclo eritrocítico tiene una duración aproximada de 48 horas para *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* y 72 para *Plasmodium malariae*.

PERÍODO PREPATENTE

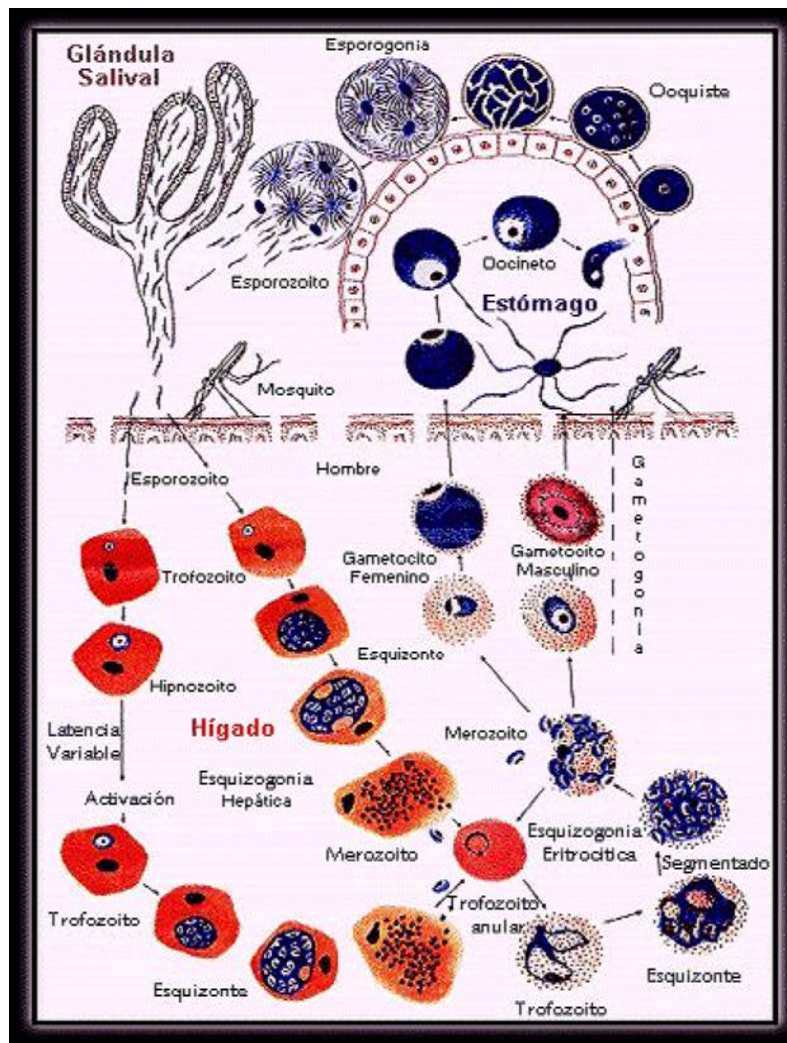
Es el tiempo que transcurre entre la picadura del mosquito y la aparición del parásito en la sangre, y varía de 6 a 9 días en los casos de infección por *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, de 12 a 16 días el caso de *Plasmodium malariae*. Por lo regular los gametocitos aparecen en el término de tres días de la parasitemia con *P. vivax* y después de 12 a 14 días en la infección por *P. falciparum*.

PERÍODO DE INCUBACIÓN

Es el lapso entre la picadura del mosquito infectante y la aparición del cuadro clínico. Es de unos 12 días para *P. falciparum*, 14 para *P. vivax* y 30 para *P. malariae*.

SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD

Después del período de incubación, los síntomas se presentan bruscamente con escalofríos intensos, fiebre y sudoración profusa; los cuales se presentan como accesos intermitentes cada 48 ó 72 horas que corresponden a la ruptura de los esquizontes, aunque también se pueden presentar todos los días sin intermitencia. Se puede presentar, dolor de huesos, dolor de cabeza, dolores musculares, decaimiento, malestar general y trastornos digestivos, pudiendo confundirse con una infección viral u otras enfermedades.



Ciclo biológico del *Plasmodium*

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico de la enfermedad comprende:

Diagnóstico epidemiológico:

Se basa en los antecedentes recopilados en la encuesta epidemiológica a través del interrogatorio al paciente. Es importante conocer:

- Si ha viajado o vivido en áreas con transmisión malárica.
- Si ha estado en contacto con parientes o conocidos con paludismo reciente.
- Si se han presentado en la comunidad casos conocidos de malaria.
- Si ha padecido paludismo en un pasado reciente.

Diagnóstico clínico:

Basado en las manifestaciones clínicas presentadas por el enfermo: fiebre, escalofríos, sudoración, cefalea, decaimiento, malestar general, dolores articulares y musculares.

Diagnóstico del laboratorio:

Diagnóstico parasitológico

Consiste en el examen microscópico de la muestra de sangre para demostrar la presencia del parásito, mediante la técnica de gota gruesa y extendido coloreados con Giemsa.

Gota gruesa

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

Extendido

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

Diagnóstico inmunológico

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

Una variedad de métodos serológicos han sido evaluados para el diagnóstico de la malaria tales como la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), el Inmunoensayo enzimático (ELISA), Hemaglutinación Indirecta (HAI) y Radioinmunoensayo (RIA).

Recientemente se han introducido pruebas inmunocromatográficas o pruebas rápidas que se basan en la detección de antígenos presentes en los parásitos del género *Plasmodium*, mediante reacciones antígeno – anticuerpo que se producen sobre tiras de nitrocelulosa.

Las pruebas inmunocromatográficas en tiras reactivas eliminan la necesidad de la observación con microscopio y ofrecen la posibilidad de contar con pruebas diagnósticas del paludismo en lugares que no cuentan con servicios básicos de salud especialmente en áreas de difícil acceso.

Las pruebas ICT Pf/Pv y OptiMAL IT® pueden distinguir la infección producida por *Plasmodium falciparum* de otras especies de paludismo humano. La prueba OptiMAL IT®, que utiliza anticuerpos específicos que detectan la enzima metabólica lactato deshidrogenasa (pLDH) en parásitos vivos ha mostrado ser más sensible que la prueba ICT Pf/Pv.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA HEMÁTICA

LIMPIEZA Y ALMACENAJE DE LÁMINAS PORTAOBJETO

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

Es preferible descartar láminas portaobjeto cuando:

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

Las láminas portaobjetos limpias podrán ser envueltas en papel delgado en grupos de 25 o colocadas en lamineros. Los paquetes así seleccionados para uso de toma de muestra serán almacenados en cajas de cartón y en lugares secos (evitando polvo y humedad) para uso posterior, y separando simultáneamente las de uso diario.

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

REGISTRO

Para asegurar la fácil localización de los pacientes es importante llenar la información requerida en la encuesta de malaria (Anexo G). No olvidar que equivocarse en el llenado correcto de estos formatos de registro, puede ser lo mismo que equivocarse en la lectura de la gota gruesa.

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

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

La gota gruesa está conformada por numerosas capas de células sanguíneas, en su mayoría glóbulos rojos, que son deshemoglobinizados durante la coloración con Giemsa. Esta

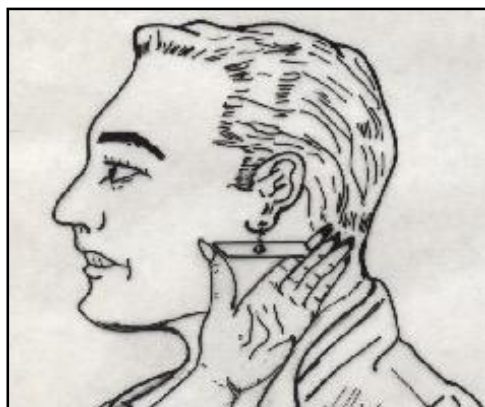
concentración de glóbulos rojos facilita la detección de los parásitos que pudieran estar presentes en el interior de alguno de ellos cuando la densidad es baja.

El extendido consiste en una capa delgada, única de células sanguíneas, lo que facilita la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes en los glóbulos rojos, sobre todo para la identificación de la especie del parásito, cuando éste no ha podido ser identificado por gota gruesa.

El extendido sirve para identificar la lámina, el rotulado se hace con lápiz de grafito.

Después que los datos del paciente han sido registrados en forma apropiada, se procede a la obtención de las muestras de sangre de la siguiente manera:

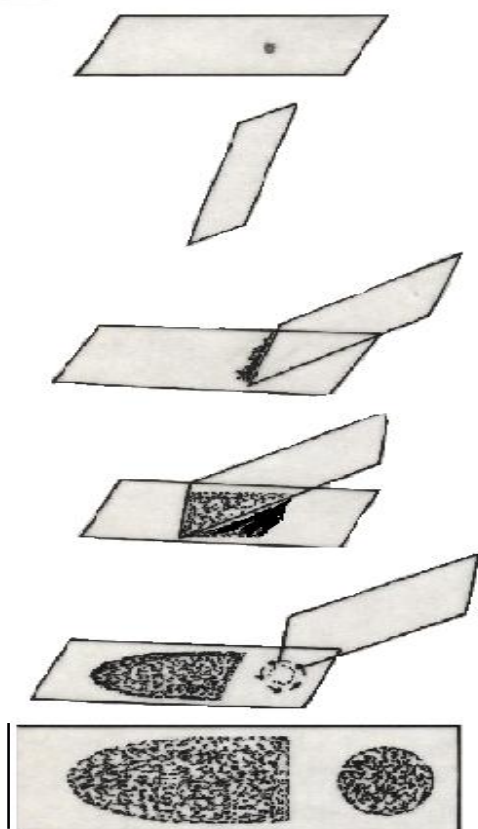
1. Sostener el lóbulo de la oreja del paciente con la mano izquierda, limpiar con la mano derecha el área sostenida con un algodón humedecido en alcohol.
2. Secar con algodón limpio y seco, utilizando golpes firmes para estimular la circulación de la sangre.
3. Pinchar el lóbulo de la oreja con la lanceta estéril en posición perpendicular con la superficie de éste.



4. Limpiar con un algodón seco la primera gota de sangre y con la siguiente hacer el extendido.
5. Tomar del laminero la primera lámina con la mano izquierda, por los bordes menores, utilizando el pulgar para tomar un borde y el otro con el índice y medio. Evitar tocar la superficie de las láminas con los dedos, pues se ensucian y engrasan, lo que es inconveniente para lograr un buen extendido.
6. Acercar esta primera lámina, al lóbulo de la oreja y colocar sobre ella una gota de sangre pequeña, aproximadamente de cinco milímetros cúbicos, en la unión del tercio medio con el tercio externo de la lámina.
7. Tomar la segunda lámina del laminero y colocar sobre la primera en ángulo de 45°, por delante de la gota de sangre pero contactando con ella. Dejar que se extienda sin que llegue a los bordes e iniciar un movimiento suave y uniforme en dirección al dedo pulgar izquierdo, con lo cual se obtendrá el extendido.
8. La precisión de este movimiento lo da la práctica. El extendido debe tener unos 35 milímetros de largo por 20 mm. de ancho aproximadamente. Inmediatamente de

realizado el extendido, agitar al aire, para obtener una rápida desecación de la sangre y evitar la deformación de los glóbulos rojos. Por este motivo es necesario obtener el extendido antes que la gota gruesa.

9. Colocar 3 ó 4 gotas de sangre más grandes (15 a 20 milímetros cúbicos, aproximadamente) en el tercio externo de la lámina que ha quedado libre después de practicado el extendido.
10. Con ayuda de la segunda lámina (lámina auxiliar), utilizada para realizar el extendido, utilizando uno de sus ángulos practicaremos movimientos circulares de la sangre para hacer la gota gruesa, hasta darle un diámetro de unos 15 milímetros (1,5 cms). Con este procedimiento extraemos la fibrina, la cual queda adherida a la esquina de la lámina.
11. Una vez obtenida la gota gruesa y el extendido correspondiente, secar el lóbulo de la oreja pinchada y pasar una torunda de algodón humedecido en alcohol e indicar al paciente que presione el lugar de la punción durante 5 minutos.
12. Dejar secar el extendido y proceder a identificar la lámina con ayuda de un lápiz de grafito, escribiendo en la parte más gruesa, el número, código y fecha (zona no adecuada para la observación microscópica). No utilizar bolígrafo para etiquetar la lámina. Dejar secar la lámina con el extendido y la gota gruesa en una superficie plana y protegida de polvo, calor e insectos.
13. Colocar la lámina con el extendido y gota gruesa después de seca, en el laminero.
14. La segunda lámina (lámina auxiliar) utilizada para esparcir la sangre es utilizada para el siguiente paciente y una tercera lámina limpia del laminero será usada como extensora, y así sucesivamente hasta completar las 25 láminas del laminero.



1. Lámina con la gota de sangre para realizar el extendido.
2. Lámina auxiliar para realizar el extendido.
3. La segunda lámina se coloca sobre la primera delante de la gota de sangre pero en contacto con ella en ángulo de 45° y por capilaridad la sangre se extiende.
4. Sin que la sangre llegue a los bordes con un movimiento suave y continuo, la segunda lámina se desliza para realizar el extendido.
5. Con una de las esquina de la segunda lámina, se hacen movimientos circulares para efectuar la gota gruesa.
6. Lámina con Extendido y Gota Gruesa.

SECADO DE LAS MUESTRAS HEMÁTICAS

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

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

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

Cuando un largo almacenamiento es inevitable, las gotas deben ser deshemoglobinizadas dentro de las siguientes 24 horas para evitar la fijación y contaminación por hongos.

ERRORES COMUNES EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS HEMÁTICAS

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

Mala posición de las muestras de sangre

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

Mucha sangre

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

Poca sangre

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

Lámina con grasa

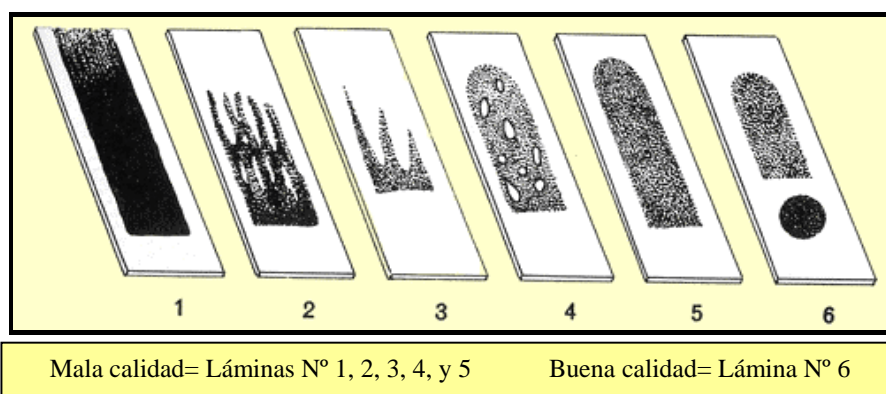
En una lámina sin desengrasar, la sangre se esparcirá irregularmente, lo que hará difícil el examen; por otro lado, parte de la gota gruesa en algunos casos puede desprenderse durante el proceso de coloración.

Si el borde de la lámina extensora es irregular

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

El frotis demasiado grande y la gota gruesa mal ubicada

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



Muestras de diferente calidad de recolección

Otros errores comunes

- Dejar las láminas expuestas a moscas, cucarachas, hormigas y otros insectos que se alimentan de sangre seca y dañan las muestras de sangre.
- Realizar extendidos y gotas en muestras de sangre en láminas mal seleccionadas o rayadas.
- Secado irregular de la gota gruesa.
- Permitir la auto fijación de la gota gruesa que ocurre con el transcurrir del tiempo o a través de la exposición al calor, por lo que la coloración se hace difícil e insatisfactoria.
- No utilizar bolígrafo para identificar la lámina. Luego de secado el extendido, rotular con lápiz de grafito.



Identificación de la muestra

Observación

La toma de muestra del dedo no es recomendable por el peligro de infección, pero si el paciente presenta traumatismos del lóbulo de la oreja (eczemas, u otros), se tomará la muestra del dedo medio o anular, sosteniendo la mano izquierda con la palma hacia abajo. En los niños puede ser utilizado el dedo gordo del pie.



Punción digital

Envío al laboratorio de los extendidos y gota gruesa

1. Hacer el paquete de 25 láminas tomando una tira de papel de 1,5 mt de largo por 7,5 cms de ancho y en uno de sus extremos colocar la primera lámina, la cual debe tener la gota gruesa y extendido totalmente secos y darle la vuelta para cubrirla con el papel y así sucesivamente. El largo del papel permite empaquetar 25 láminas. El paquete debe realizarse lo suficientemente apretado para que las láminas no se salgan y al finalizar se coloca cinta adhesiva o pega para cerrarlo, y en uno de los lados se escriben los datos, especificando: Región, municipio, mes, año y cantidad de las láminas.
2. Las láminas positivas deben separarse de las negativas para hacer los paquetes.
3. Adjuntar al paquete la hoja de registro F.37-58 (Anexo H), la cual debe completarse con los datos solicitados y se anexa con una banda de goma.
4. El paquete ya listo debe ser colocado en una cajita de cartón para ser enviado al Laboratorio Regional y de éste al laboratorio Central para su reexaminación y control de calidad.

COLORACIÓN DE LA MUESTRA HEMÁTICA PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE MALARIA

USO DEL COLORANTE GIEMSA

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

RECOMENDACIONES PARA UNA BUENA COLORACIÓN

1. Asegúrese que la gota gruesa y el frotis estén secos antes de iniciar el proceso de tinción.
2. Puede acelerarse el secado empleando calor suave, por ejemplo, exponiéndolos al calor generado por una lámpara. Evite utilizar demasiado calor ya que esto puede dificultar la deshemoglobinización.
3. Mantenga el envase (vidrio ámbar u oscuro) que contiene el colorante giemsa, cerrado y en lugar seco, fresco y protegido de luz solar directa. Así evitará la volatilización del solvente y la oxidación del colorante prolongando la duración de la solución.
4. Nunca añada agua al colorante o deje entrar una pipeta mojada. Esto puede provocar deterioro de la solución de modo que esta no colorea adecuadamente.
5. No agite la botella de colorante antes de utilizarla. Se suspenderían pequeños cristales de colorante que no han sido disueltos, los cuales pueden visualizarse en las muestras de sangre durante el proceso de coloración y dificultarían el examen al microscopio.
6. Nunca regrese el colorante diluido no utilizado al envase que contiene la solución madre.
7. El material de vidrio usado para guardar colorante giemsa debe ser lavado en agua limpia inmediatamente después de ser utilizado para retirar los restos del colorante.
8. El material usado debe remojar por algún tiempo, preferiblemente toda la noche, en una solución de detergente y posteriormente, debe ser enjuagado totalmente en agua limpia. Los residuos de detergente en el material de vidrio pueden alterar el pH de su contenido y estropear el colorante.

COLORACION DE LAS MUESTRAS HEMÁTICAS

FIJACIÓN DE EXTENDIDOS

Después de tomar la muestra, se procede a la fijación del extendido con la finalidad de conservar la morfología de los elementos celulares y por lo tanto, poder realizar el diagnóstico de especie del parásito y se puede realizar en forma: individual, en grupos y en bloque o masa de veinticinco láminas.

Fijación de extendido en forma individual

Procedimiento

1. Colocar sobre el extendido unas gotas de alcohol metílico y dejar actuar por 2 minutos cuando el extendido tiene 24 horas ó más de haber sido tomado y por 30 segundos si es reciente.
2. Quitar el exceso de alcohol metílico, inclinando la lámina en dirección contraria a la gota gruesa para evitar que se ponga en contacto con ella y la fije.
3. Colocar la lámina en el porta-lámina con la gota gruesa hacia arriba y dejar que se seque al aire.

Fijación de extendido en grupos

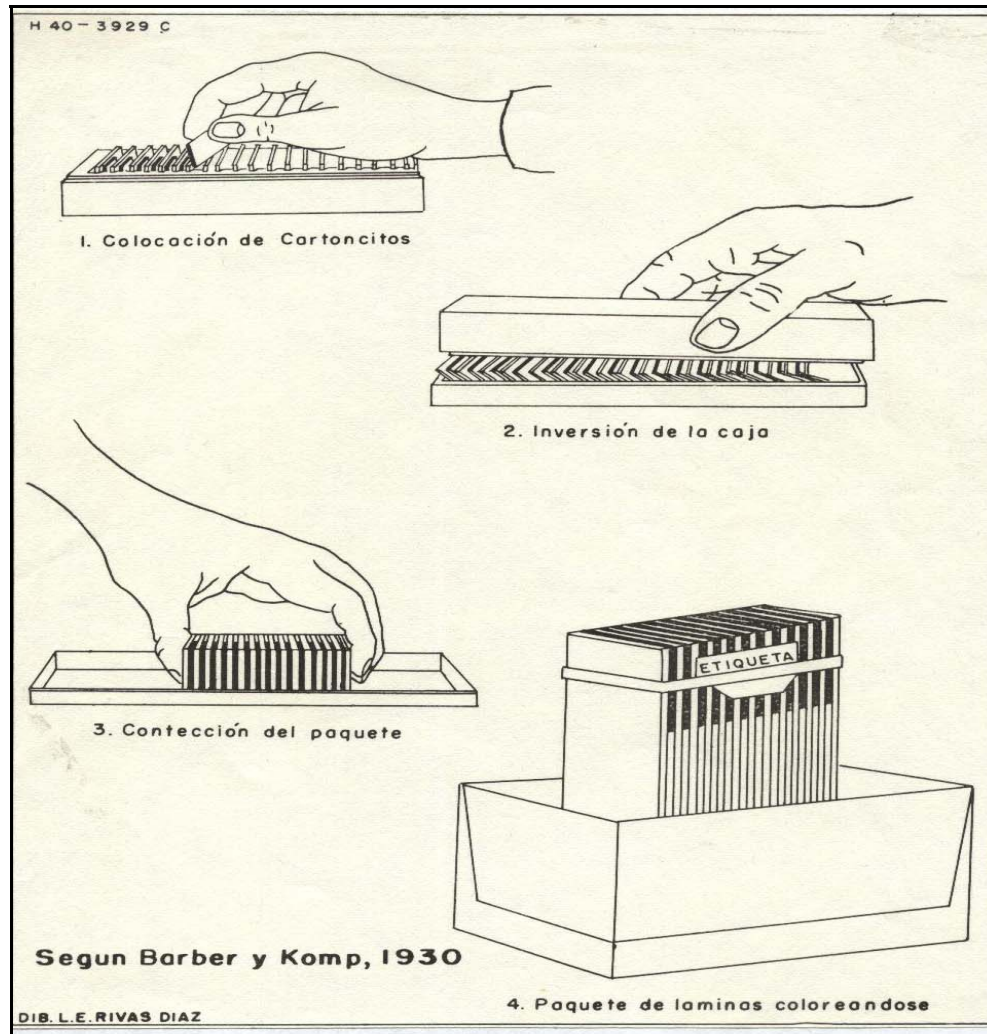
Procedimiento

1. Colocar en un vaso de Koplín, alcohol metílico.
2. Introducir las láminas con el extendido hacia abajo, cuidando que el metanol cubra totalmente al extendido, pero que no alcance la gota gruesa para evitar que la fije. Tener precaución de que las láminas que se coloquen en ambos extremos del vaso de Koplín (la primera y la última ranura) tengan los extendidos y gotas gruesas mirando hacia el centro del vaso pues si miran hacia la pared del mismo, se corre el riesgo de que el alcohol metílico alcance a la gota gruesa y la fije. Fijar por 2 minutos cuando el extendido tiene más de 24 horas de haber sido tomado, o por 30 segundos si está reciente.
3. Sacar las láminas del fijador, colocarlas en el porta-láminas con la gota gruesa hacia arriba y dejar secar al aire.

Fijación de extendido en bloque o masas de veinticinco láminas

Procedimiento

1. Colocar en un laminero 25 láminas con los extendidos a la derecha, las gotas gruesas quedarán a la izquierda.
2. Colocar entre cada dos láminas, hacia la parte izquierda o sea hacia donde están las gotas gruesas, un cartoncito rectangular de 25 x 30 milímetros de lado y de espesor aproximado al de una lámina.
3. Cubrir el laminero con su tapa y darle vuelta a la izquierda, de esta manera quedarán las láminas y sus cartoncitos sobre la tapa del laminero.
4. Este paquete, se sujeta con una cinta de papel de 3,5 cms de ancho por 21 cms de largo por el extremo de las láminas donde están las gotas gruesas y los cartoncitos intercalados, asegurándolo luego con una banda de goma.
5. Tomar un vaso de precipitado de 250 ml y colocar en él 125 ml. de alcohol metílico el cual debe cubrir totalmente los extendidos, pero no alcanzar las gotas gruesas para evitar que se fijen. Fijar durante 2 ó 3 minutos.
6. Sacar el bloque de láminas del fijador y dejarlas secar sobre papel absorbente.



Nota: De las tres técnicas mencionadas, la más utilizada es la de fijación en grupo, cuando se trata de un cierto volumen de trabajo, siempre que se tengan suficientes vasos de Koplín por ser más rápida y más fácil de realizar.

DEHEMOGLOBINIZACIÓN DE GOTAS GRUESAS

Puede hacerse en forma individual, en grupos y en bloques o paquete de 25 láminas, con la finalidad de romper los glóbulos rojos, extraer la hemoglobina y evidenciar los parásitos maláricos que pueden estar dentro de ellos y que queden adheridos a la lámina.

Si la muestra tiene menos de 24 horas de haber sido tomada, no es necesario deshemoglobinar, se procede luego del secado a la coloración.

Deshemoglobinización Individual

Procedimiento

1. Colocar en un vaso de precipitado de 50 ml solución buffer pH 7.2 en cantidad suficiente para cubrir la gota gruesa.
2. Introducir la lámina con la gota gruesa hacia abajo, verticalmente, para que quede completamente cubierta por el buffer pero sin llegar al extendido. Deshemoglobinizarse durante 5 minutos; si la gota gruesa es de reciente recolección, menos de 24 horas, se omite este proceso. Puede necesitarse más tiempo para lograr la deshemoglobinización completa, si tiene más de 24 horas de recolección.
3. Sacar la lámina y dejarla secar en el porta-láminas.

Deshemoglobinización en grupo de gotas gruesas

Procedimiento

1. Colocar en un vaso de Koplín buffer pH 7.2 en cantidad suficiente para cubrir la gota gruesa.
2. Introducir verticalmente en el vaso de Koplín las láminas con las gotas gruesas hacia abajo cuidando que queden completamente cubiertas por el buffer, sin llegar a los extendidos. Deshemoglobinizarse durante 5 minutos o más en caso de ser necesario.
3. Sacar las láminas y dejarlas secar en el porta-láminas

Deshemoglobinización en bloque o paquete de 25 láminas

Procedimiento

1. Colocar en un laminero las 25 láminas, con los extendidos a la derecha y por ello las gotas gruesas quedarán a la izquierda.
2. Colocar entre cada dos láminas hacia la parte derecha, o sea hacia donde quedan los extendidos, un cartoncito con lo que se consumirán veintiséis en total.
3. Cubrir el laminero con su tapa y darle vuelta a la derecha; de esta manera quedarán las láminas y sus cartoncitos sobre la tapa del laminero
4. A este paquete se le coloca una cinta de papel de 3.5 cm de ancho por 21 cms de largo aproximadamente, en el extremo de las láminas donde están los extendidos y los cartoncitos intercalados, asegurándolo luego con una banda de goma.
5. Tomar un vaso de precipitado de 250 ml y colocar en 75 ml de buffer pH 7.2.
6. Introducir en este vaso el paquete con las veinticinco láminas verticalmente con las gotas gruesas hacia abajo y dejarlas deshemoglobinizarse por un tiempo de 5 minutos.
7. Sacar el paquete de láminas, dejarlo secar verticalmente colocado sobre papel absorbente para facilitar el secado.

COLORACIÓN

Luego de fijado el extendido, y deshemoglobinizada la gota gruesa, se procede a la coloración con la finalidad de diferenciar las distintas especies de parásitos maláricos y los demás elementos celulares de acuerdo a la afinidad por el colorante (Giemsa).

El colorante Giemsa debe prepararse en el momento de usarlo, de la siguiente manera:

Colorante Giemsa..... 3 gotas

Buffer pH 7.2..... 1 ml

Esta solución, debe prepararse en un vaso de precipitado previamente lavado con agua destilada y seco, de la siguiente manera: con un gotero se toman 20 gotas de buffer pH 7.2 o se mide 1 ml con pipeta (1 ml equivale a 20 gotas) y se colocan en el vaso de precipitado, se le agregan 3 gotas de colorante Giemsa, que se tomarán con un gotero totalmente seco.

Agitar suavemente el vaso de precipitado hasta completar la dilución. Si se agita fuertemente, se puede producir la precipitación del colorante. La coloración de la lámina puede realizarse de las siguientes formas: sucesiva, simultánea o en paquete de 25 láminas.

COLORACIÓN SUCESIVA

Procedimiento

Primero se colorea la gota gruesa, si está positiva a malaria, se colorea el extendido.

1. Medir con una pipeta graduada 2 ml de buffer pH 7.2 y añadir 6 gotas de colorante.
2. Agitar suavemente para evitar la precipitación del colorante.
3. Colocar la lámina en la bandeja de coloración y cubrir la gota gruesa y se deja actuar el colorante por un tiempo de 20 minutos.
4. Terminando el tiempo, lavar con buffer pH 7.2.
5. Dejar secar la lámina en el porta-lámina.

COLORACIÓN SIMULTÁNEA

Procedimiento

Se colorea la gota gruesa y extendido al mismo tiempo; se utilizan 5 ml de buffer pH 7.2 para cubrir una lámina.

1. Se prepara la dilución del colorante de la misma forma, dicha anteriormente (3 gotas de colorante y 1 ml de buffer pH 7.2; para 5 ml se toman 15 gotas de colorante. Agitar suavemente.
2. Cubrir totalmente el extendido y la gota gruesa, con la solución colorante y dejar actuar por 20 minutos.
3. Lavar con buffer pH 7.2 estando la lámina en posición horizontal en el soporte sobre la cubeta, para impedir que se deposite sobre la lámina, una fina película metálica, que flota sobre la disolución del Giemsa. Después puede continuarse el lavado con la lámina en posición inclinada, hasta que el agua del lavado no arrastre color.
4. Dejar secar.

COLORACIÓN EN BLOQUE, MASA O PAQUETE DE 25 LÁMINAS

Procedimiento

En trabajos de campo, se reciben gran número de láminas para diagnosticar, para ello se procede primero a la coloración de gotas gruesas, que nos permiten rápidamente determinar los casos positivos o no. Las láminas positivas, son seleccionadas para proceder a la coloración de los extendidos, que nos permiten identificar la especie del parásito, la fase y la densidad parasitaria..

La coloración de gotas gruesas en masa, bloque o paquete de 25 láminas, con Giemsa se efectúa según la técnica de Barber y Komp, 1930, de la siguiente manera:

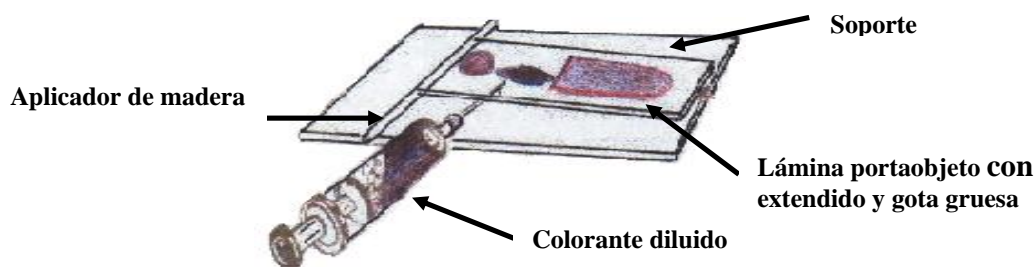
1. El paquete hecho previamente para deshemoglobinizar, se introduce verticalmente con las gotas gruesas hacia abajo en un vaso de precipitado de 250 ml que contenga 75 ml de la solución colorante, preparada de la siguiente forma: se mide 75 ml de buffer pH 7.2 y se le añade 50 gotas de colorante, dejándolo actuar durante 40 minutos.
2. Sacar el paquete de láminas y colocarlo en otro vaso con buffer pH 7.2 para lavarlo, descartar y hacer un lavado de 5 minutos, con el buffer.
3. Sacar el paquete, y colocarlo en forma vertical sobre papel absorbente y dejarlo secar.

COLORACIÓN DE GIEMSA MODIFICADA

En este método de coloración se coloca la lámina en forma invertida, con la finalidad de disminuir la posibilidad de precipitado del colorante.

Procedimiento

1. Fijar el extendido.
2. Deshemoglobinizar la gota gruesa.
3. Preparar el colorante utilizando buffer pH 6.8 (3 gotas de colorante x 1 ml de buffer pH 6.8.)
4. Colocar la bandeja de coloración sobre una superficie plana y acomodar las láminas en forma invertida (con la muestra hacia abajo).
5. Añadir el colorante dejándolo fluir por el borde de la lámina y dejarlo actuar durante 20 minutos.
6. Enjuagar con agua de chorro.
7. Levantar la lámina y dejar secar al aire libre en el porta-lámina.



OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS PARÁSITOS DE MALARIA

Se necesita un microscopio compuesto con fuente de luz propia o con sistema de espejos para recibir luz natural o artificial. La luz se debe hacer pasar por un filtro azul, esto facilita la visualización de los parásitos.

RECONOCIMIENTO DE LOS PARÁSITOS MALÁRICOS

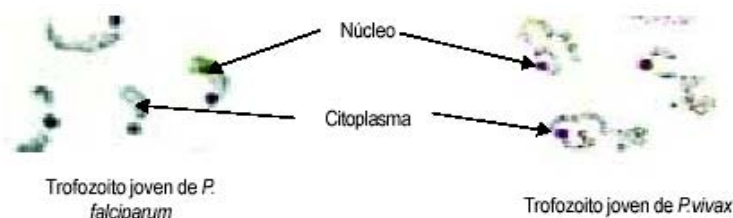
Los parásitos de malaria toman con la coloración de Giemsa un aspecto determinado en la gota gruesa y el extendido que permite el reconocimiento del tamaño y la forma del parásito.

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

ASPECTOS DEL PARÁSITO DE MALARIA EN SUS DIFERENTES ESTADIOS

Etapa de trofozoito joven

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



Etapa de trofozoito mediano y adulto

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

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

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



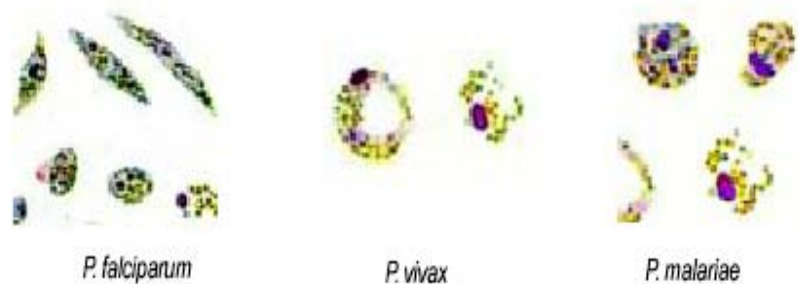
Etapa de esquizonte

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



Etapa de gametocito

El gametocito es el estadio sexual en el cual el parásito llega a ser masculino o femenino, éste proceso de maduración se completa en el estómago del anofelino hembra. La morfología de los gametocitos depende de la especie. El gametocito masculino es llamado microgametocito y el gametocito femenino macrogametocito. En malaria por *P. falciparum* se pueden ver en sangre periférica gametocitos y anillos a diferencia de *P. vivax* en el que se visualiza todos los estadios parasitarios.



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

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

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

APARIENCIA DE LOS PARÁSITOS EN GOTA GRUESA Y FROTIS

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



En el estadio de trofozoito, los *Plasmodium* presentan tres características indispensables, presentes tanto en la gota gruesa como en el frotis: citoplasma azul violáceo o azul cielo, núcleo rojo intenso o rojo grosella, y pigmento amarillo pálido o castaño oscuro o negro (dependiendo de la especie y de las formas maduras del parásito).

En las preparaciones sanguíneas las siguientes estructuras pueden confundirse con parásitos de malaria: plaquetas adheridas a los eritrocitos en las extensiones sanguíneas, conglomerados de plaquetas, fragmentos de leucocitos en las preparaciones de gota gruesa, colorante precipitado, restos de piel del paciente, polvo, bacterias, levaduras, esporas y otros microorganismos que caen en la preparación (si no se tienen protegidos) mientras se está secando, y algas u otros organismos que pueden estar contaminando el colorante.

EXAMEN DE RUTINA DE LA GOTTA GRUESA Y DEL FROTIS

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

Exámen de la gota gruesa

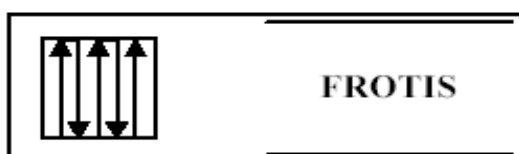
El examen de rutina de la gota gruesa requiere observar 100 campos microscópicos óptimos a un aumento final de 1000 X, con lente de inmersión.

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

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

Procedimiento

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



Recorrido de la gota gruesa durante la observación microscópica

Examen del extendido de sangre

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

Se debe realizar en las siguientes circunstancias:

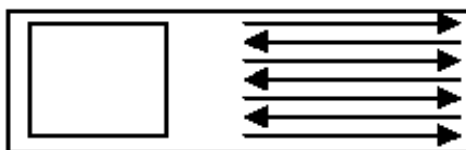
- a. Cuando no es posible examinar la gota gruesa por alguna razón (Ejemplo: por ser muy pequeña).
- b. Cuando no es posible identificar en la gota gruesa la(s) especie(s) de *Plasmodium*.

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

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

Procedimiento

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



Recorrido del frotis durante la observación microscópica

CARACTERÍSTICAS DE LOS PLASMODIOS HUMANOS

Características	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Edad de los glóbulos rojos parasitados	Jóvenes y maduros	Reticulocitos y GR jóvenes	GR maduros	Reticulocitos y GR jóvenes
Hipertrofia del glóbulo rojo parasitado	NO	SI	NO	SI
Granulaciones	Manchas de Maurer	Schüffner	Ziemann	Schüffner
Hiperparasitismo	Frecuente	Rara	Muy rara	Muy rara
Estadios eritrocíticos	Anillos y gametocitos	TODOS	TODOS	TODOS
Macro y microgametocitos	Media luna	Redondos	Redondos	Redondos
Nº de merozoitos por esquizonte eritrocítico	6-32	12-24	6-12	8-12
Hipnozoitos hepáticos	NO	SI	NO	SI
Knobs	SI	NO	NO	NO
Esquizogonia	En capilares de los órganos profundos	Sangre periférica	Sangre periférica	Sangre periférica
Duración del ciclo eritrocítico	48 horas	48 horas	72 horas	48 horas
Nº de merozoitos por esquizonte maduro (EE)	40.000	10.000	12.000	15.000
Receptores en glóbulos rojos	Glicoforina A	Grupo Duffy	ND	ND
Recaída/Recrudescencia	Recrudescencia	Recaída	Recrudescencia	Recaída

CARACTERÍSTICAS DE LOS PLASMODIOS EN UN EXTENDIDO DE SANGRE

Características	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. ovale</i>
Eritrocitos infectados hipertrofiados	NO	SI	NO	SI
Eritrocitos infectados ovals irregulares	NO	NO	NO	SI
Eritrocitos infectados pálidos	NO	SI	NO	SI
Eritrocitos con gránulos de Schüffner	NO	SI	NO	SI
Eritrocitos infectados con infección múltiple	SI	RARO	NO	NO
Parásitos: se ven todos los estadios	RARO	SI	SI	SI
Se ven sólo anillos y/o gametocitos	SI	NO	NO	NO
Formas de aplique (accolé)	SI	NO	RARO	NO
Gránulos de cromatina doble	SI	RARO	NO	NO
Gametocitos en media luna	SI	NO	NO	NO
Formas en banda	NO	NO	SI	NO
Nº merozoitos/esquizonte	6-32	12-24	6-12	8-12

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL *Plasmodium vivax*

1. Hipertrofia al glóbulo rojo parasitado a partir de la forma evolutiva de trofozoito mediano.
2. El parasitismo múltiple se observa rara vez.
3. Las granulaciones de Schüffner están con frecuencia presentes en los glóbulos rojos parasitados a partir de la forma evolutiva de trofozoito mediano.
4. El citoplasma del trofozoito mediano se observa con frecuencia con movimiento ameboidea.
5. Las formas de anillo maduras tienden a ser grandes y gruesas.
6. Generalmente se observa todas las formas evolutivas en sangre periférica.
7. Parasita con frecuencia los glóbulos rojos jóvenes y reticulocitos.
8. Produce la fiebre terciana benigna.

Estudio del *Plasmodium vivax* en extendido

1. **Trofozoitos jóvenes:** Tienen la forma de anillo que ocupa alrededor de 1/3 a 1/4 del eritrocito parasitado, con grueso punto cromático situado en la periferia. El citoplasma es denso, teñido de azul y vacuola definida. Estos anillos llenan alrededor de 1/3 a 1/4 del glóbulo rojo. (Dibujo: diámetro del glóbulo rojo: 7,5 cm)
2. **Trofozoitos medianos:** Tienen forma de anillo con núcleo más grande y citoplasma más abundante que en el estadio anterior, con una o más vacuolas definidas. El citoplasma se presenta con pseudópodos los cuales indican los movimientos ameboides característicos de la especie. Se observan gránulos de pigmento marrón amarillento que son pequeños y angulares que crecen con la edad del parásito. El parásito ocupa 1/4 a 3/4 del eritrocito. A partir de este estadio se puede observar la hipertrofia del eritrocito y las granulaciones de Schüffner. (Dibujo: diámetro del eritrocito: 8,0 cm)
3. **Trofozoitos adultos:** Núcleo de color rojo intenso, formado por abundante masa de cromatina, situado generalmente en la periferia del parásito; el citoplasma es más compacto de contorno irregular, con porciones más espesas que otras y finos gránulos de pigmento de color marrón oro. Puede o no tener vacuola. Debido a lo compacto del citoplasma se tiñe más intensamente; casi llena el eritrocito hipertrofiado. Se observan granulaciones de Schüffner. (Dibujo: diámetro del glóbulo rojo: 8,5 cm)
4. **Esquizontes presegmentados:** Núcleo dividido primero en dos y luego en varias masas cromáticas de forma irregular; citoplasma compacto. Pigmento distribuido por el citoplasma y a veces con tendencia a agruparse. No llena completamente el eritrocito. (Dibujo: diámetro del glóbulo rojo: 9,0 cm)
5. **Esquizontes segmentados o maduros:** Tiene forma de roseta que ocupa casi todo el eritrocito hipertrofiado, con 12 a 24 merozoitos formados por una porción de citoplasma y un punto de cromatina; el pigmento de color café oscuro se concentra en una o dos masas definidas, lo que denota que la segmentación está completa. El

parásito llena casi completamente el glóbulo rojo hipertrofiado. Se observan granulaciones de Schüffner. (Dibujo: diámetro del glóbulo rojo: 9,5 cm)

6. **Macrogametocitos:** Tienen forma redonda, que ocupa la totalidad del eritrocito hipertrofiado. Citoplasma azul, homogéneo, de contornos regulares, sin vacuola. Núcleo pequeño, compacto, de color rojo oscuro, y está rodeado frecuentemente de un halo claro situado lejos del centro (excéntrico). Pigmento oscuro de color café negruzco y grueso, distribuido por todo el citoplasma. (Dibujo: diámetro del glóbulo rojo: 10,0 cm)
7. **Microgametocitos:** El citoplasma se observa de color lila, gris o azul pálido, el núcleo alargado, difuso de color rojo pálido o rosado se extiende en el citoplasma como una bufanda o banda, situado en el centro del parásito. Los gránulos de pigmento de color café negruzco presentan una distribución más irregular y no se encuentran en la zona del núcleo. Son más pequeños que los gametocitos femeninos y nunca ocupan la totalidad del eritrocito hipertrofiado. (Dibujo: diámetro del glóbulo rojo: 9,5 cm)

Plasmodium vivax Blood Stage Parasites, Thin Blood Smears

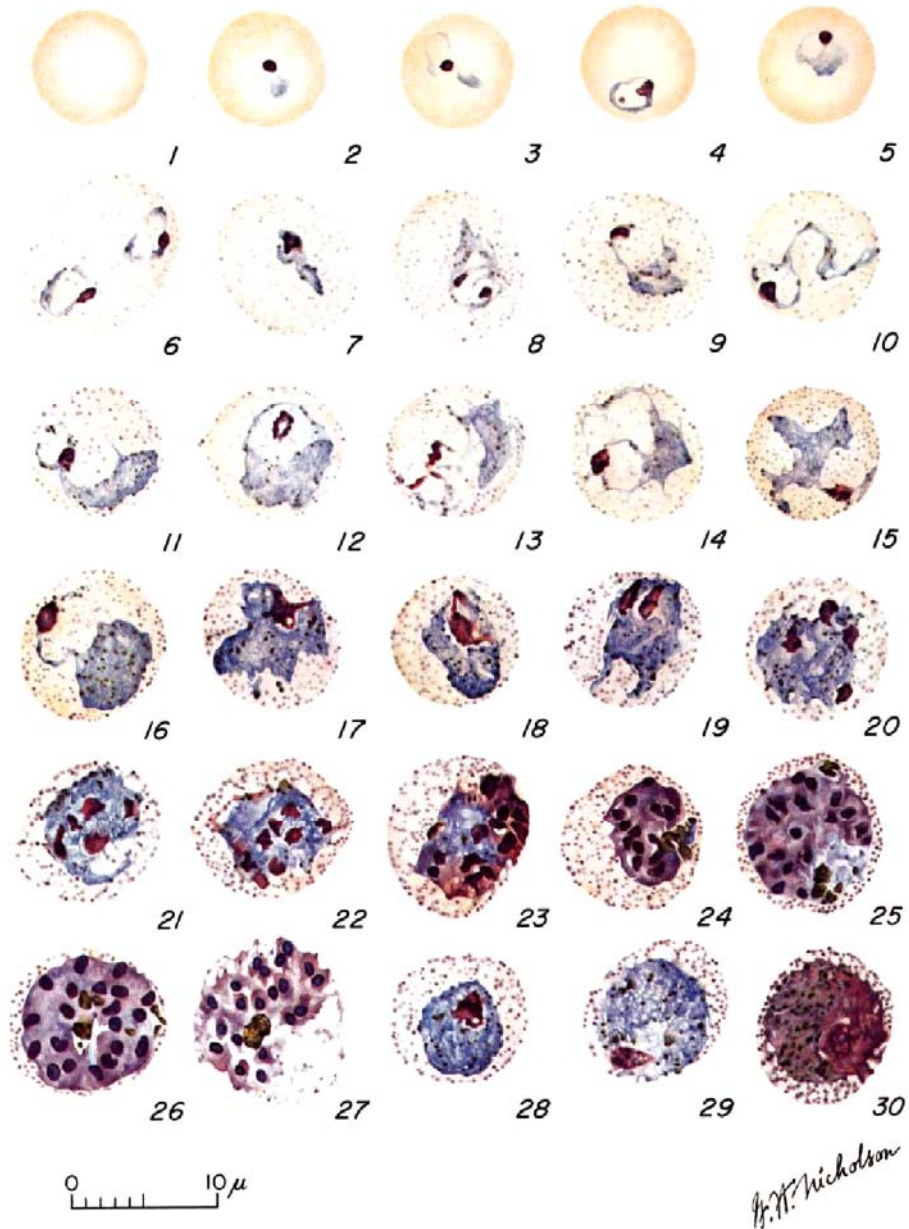


Fig. 1: Normal red cell Figs. 19-27: Schizonts
Figs. 2-6: Young trophozoites (ring stage parasites) Figs. 28 and 29: Macrogametocytes (female)
Figs. 7-18: Trophozoites Fig. 30: Microgametocyte (male)

Estudio del *Plasmodium vivax* en gota gruesa

1. **Trofozoitos jóvenes:** Se presenta en forma de anillos o comas y el núcleo es de forma redonda.
2. **Trofozoitos medianos:** Se observan en forma de anillos de mayor tamaño que los de la fase anterior, Citoplasma abundante, compacto o irregular, con tendencia a fragmentación dando el aspecto ameboideo, característica de la especie. Núcleo grande redondeado o irregular. Pigmento en forma de puntos amarillentos, de gránulos o bastoncitos.
3. **Trofozoitos adultos:** De forma redondeada u ovalada, de mayor tamaño que en la fase anterior. Citoplasma de aspecto más compacto y núcleo grande y denso. Presencia de pigmento pardo amarillento distribuido por todo el citoplasma.
4. **Esquizontes presegmentados:** Citoplasma compacto, con varios núcleos de forma irregular. Los gránulos de pigmento se observan con tendencia a agruparse.
5. **Esquizontes maduros:** Se observan merozoitos con citoplasma y núcleo claramente visible con una ó dos masas de pigmento. Generalmente el esquizonte está formado por 12 a 24 merozoitos.
6. **Macrogametocitos:** Se observa el citoplasma azulado. Núcleo rojo bien definido, situado en la periferia. Pigmento distribuido en todo el citoplasma.
7. **Microgametocitos:** Citoplasma azul pálido, núcleo central, difuso y de color rojo pálido. Gránulos de pigmento distribuidos en el citoplasma.



Plasmodium vivax **Blood Stage Parasites, Thick Blood Smears**

- 1: Ameboid trophozoites.
- 2: Schizont — 2 divisions of chromatin.
- 3: Mature schizont.
- 4: Microgametocyte.
- 5: Blood Platelets.
- 6: Nucleus of neutrophil.
- 7: Eosinophil.
- 8: Blood platelet associated with cellular remains of young erythrocytes.

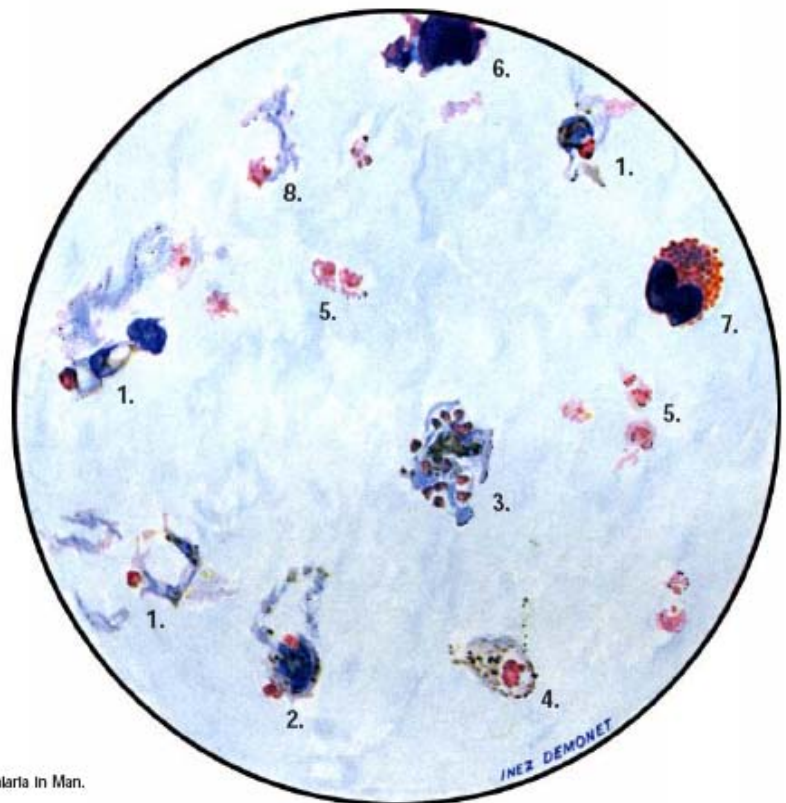


Illustration from: Wilcox A. Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, 1960.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL *Plasmodium falciparum*

1. No hipertrofia al glóbulo rojo parasitado.
2. Las manchas de Maurer pueden estar presentes, generalmente en el trofozoito mediano.
3. Las formas de anillo lucen finos y delicados.
4. Se observa con frecuencia infección múltiple (varios parásitos en una célula).
5. Algunos anillos pueden tener dos puntos de cromatina.
6. Presencia de formas accolé o marginales.
7. Es infrecuente observar todas las formas evolutivas en frotis de sangre periférica.
8. Los gametocitos tienen aspecto de salchicha o media luna. Sin embargo, no aparecen en la sangre antes de las primeras cuatro semanas de la infección.
9. Parasita glóbulos rojos jóvenes y maduros.
10. Produce la fiebre terciana maligna.

Estudio del *Plasmodium falciparum* en extendido

Dibujos: Glóbulo rojo: 7,5 cm

Macrogametocito: 12 cm diámetro mayor y 3,5 cm diámetro menor

Microgametocito: 10 cm diámetro mayor y 4,0 cm diámetro menor

1. **Trofozoitos jóvenes:** Se observan de diferentes tamaños: pequeños, medianos y grandes y muy irregulares en su forma. El citoplasma es delgado, delicado y filiforme. El núcleo es pequeño, el doble punto de cromatina es muy frecuente, así como también las formas marginales y formas en “V”. Frecuentemente se presentan infecciones múltiples en el eritrocito. Estos trofozoitos finos y delicados ocupan aproximadamente un 1/6 del eritrocito.
2. **Trofozoitos medianos:** En forma de anillos de mayor tamaño que los anteriores. El núcleo puede situarse en la parte central o periferia del parásito. Es frecuente observar el doble punto cromático. Pigmento formado por escasos gránulos marrón amarillento. Pueden observarse las manchas de Maurer, característica de la especie. Ocupa de 1/3 a 1/4 del eritrocito. Se pueden observar varios trofozoitos medianos parasitando un eritrocito (infección múltiple).
3. **Trofozoitos adultos:** Vistos en sangre periférica solamente en infecciones graves. Núcleo pequeño y compacto. Citoplasma homogéneo coloreado de azul pálido. Pigmento generalmente agrupado en una masa oscura, pequeña y densa. Puede o no tener vacuola. Ocupa aproximadamente la mitad del eritrocito.
4. **Esquizonte presegmentado:** Vistos en sangre periférica solamente en infecciones graves. Núcleo dividido en varias masas cromáticas de forma irregular. Citoplasma compacto y pigmento agrupado en una pequeña masa de apariencia casi negra. Casi llena el eritrocito.

5. **Esquizontes segmentados o maduros:** Vistos en sangre periférica solamente en infecciones graves. Generalmente formado por 8 a 32 merozoitos, los cuales son mucho más pequeños que los de las otras especies. Pigmento agrupado en una masa de apariencia casi negra.
6. **Macrogametocitos:** Forma alargada con extremos finos; es más largo y delgado que el microgametocito. Núcleo formado por una sola masa compacta, de contornos definidos, situado en el centro o ligeramente hacia los extremos, a veces oculto por el abundante pigmento oscuro, en forma de bastoncitos regados alrededor del núcleo. Citoplasma generalmente teñido de azul. Se puede observar el “babero de Laveran”.
7. **Microgametocitos:** Forma alargada en salchicha o media luna, con los extremos redondeados, es más pequeño que el macrogametocito. Núcleo difuso, central. Citoplasma rosado o azul grisáceo. Pigmento formado por gránulos o bastoncitos numerosos distribuidos alrededor del núcleo. Se puede observar el “babero de Laveran”.

Plasmodium falciparum Blood Stage Parasites, Thin Blood Smears

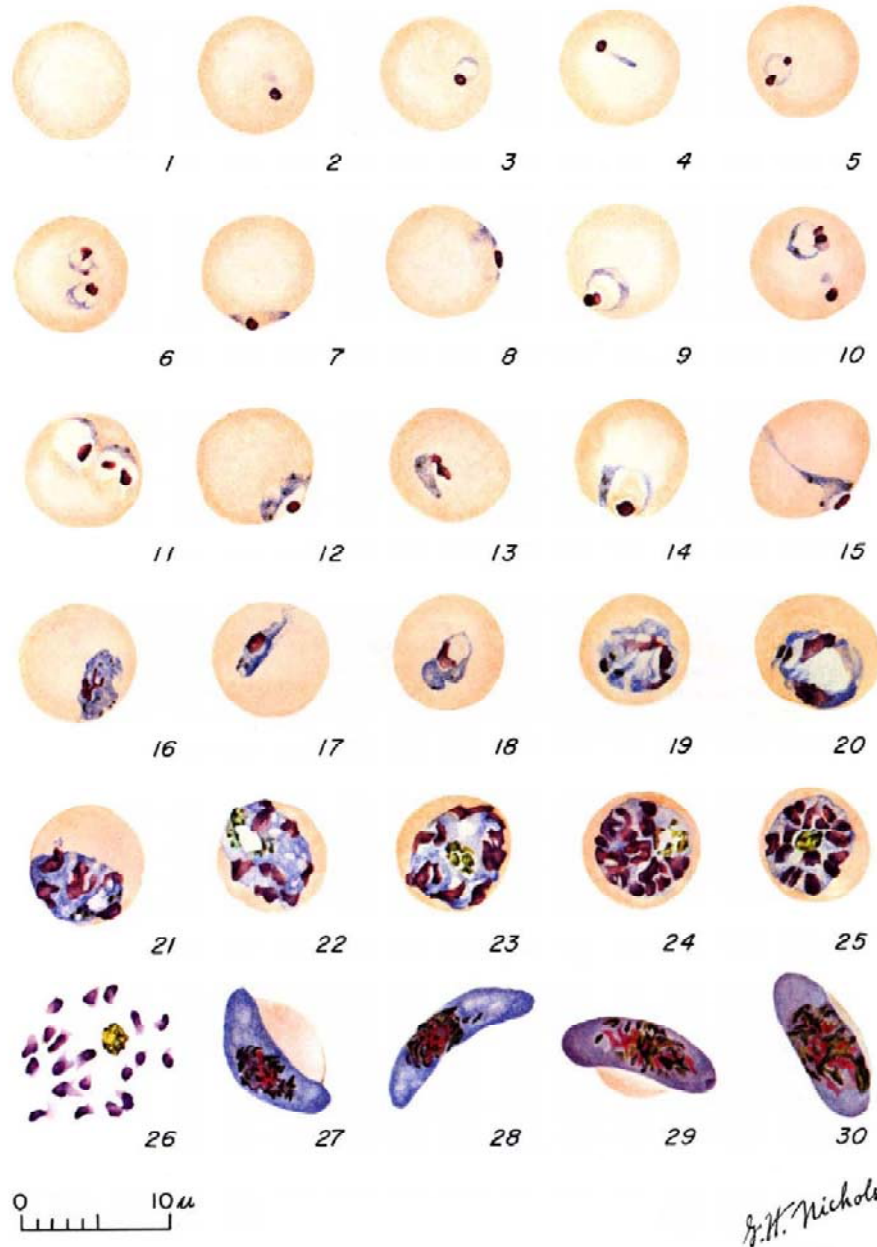


Fig. 1: Normal red cell **Figs. 19-26:** Schizonts (**Fig. 26** is a ruptured schizont) **Figs. 2-18:** Trophozoites (among these, **Figs. 2-10** correspond to **Figs. 27, 28:** Mature macrogametocytes (female) ring-stage trophozoites) **Figs. 29, 30:** Mature microgametocytes (male).

Estudio de *Plasmodium falciparum* en gota gruesa

1. **Trofozoitos jóvenes:** De tamaño pequeños con citoplasma delgado y fino. Se observan en forma de anillos o comas. Es frecuente encontrarlos e formas de llama, de media luna, en “Y” ó herradura con doble punto cromático.
2. **Trofozoitos medianos** En forma de anillos de mayor tamaño que los de la fase anterior. Se observan escasos gránulos de pigmento amarillento en el citoplasma, el núcleo es bien visible.
3. **Trofozoitos adultos:** Raros en la sangre periférica salvo en infecciones graves. Se observan redondeados con el citoplasma compacto y núcleo bien visible, formando una sola masa cromática. El pigmento se agrupa tempranamente y forma una ó dos masas oscuras y pequeñas en el citoplasma.
4. **Esquizontes presegmentados:** Raros en sangre periférica, salvo en infecciones graves. Redondeados, con varios núcleos y pigmento agrupado de color amarillento mate.
5. **Esquizontes maduros:** Raros en la sangre periférica salvo en infecciones graves. Los merozoitos son más numerosos que en las otras especies. Pigmento pardo oscuro o casi negro agrupado en 1 o 2 masas.
6. **Macrogametocitos:** Se observan en forma de salchicha, característica de la especie, con núcleo compacto de color rojo y pigmento distribuido alrededor del núcleo.
7. **Microgametocito:** Forma de salchicha, con núcleo difuso de color rosado y pigmento distribuido en el citoplasma.

Plasmodium falciparum **Blood Stage Parasites, Thick Blood Smears**

- 1: Small trophozoites.
- 2: Gametocytes — normal.
- 3: Slightly distorted gametocyte.
- 4: "Rounded-up" gametocyte.
- 5: Disintegrated gametocyte.
- 6: Nucleus of leucocyte.
- 7: Blood platelets.
- 8: Cellular remains of young erythrocyte.

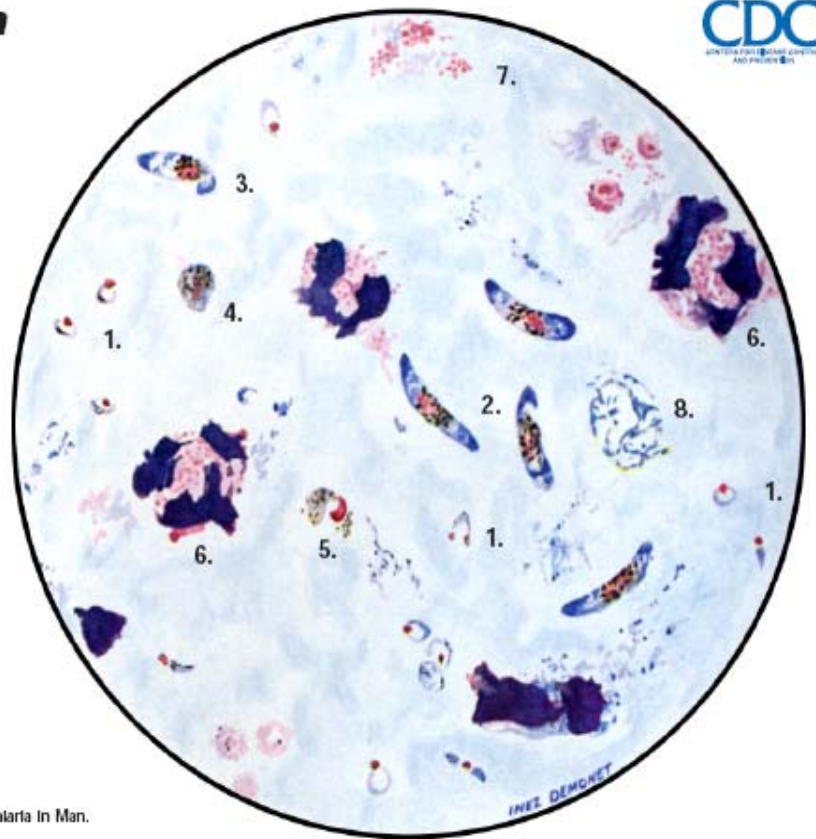


Illustration from: Wilcox A. Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria in Man. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, 1960.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL *Plasmodium malariae*

1. No hipertrofia al glóbulo rojo parasitado.
2. Las formas en banda son características de esta especie.
3. Los esquizontes maduros pueden tener un aspecto típico de margarita con 6 a 12 merozoitos.
4. Generalmente se observan todas las formas evolutivas en sangre periférica.
5. Parasita con frecuencia los glóbulos rojos maduros.
6. El punto de cromatina puede estar en la superficie interna del anillo.
7. Es la especie de evolución más lenta.
8. Produce la fiebre cuartana benigna.

Estudio del *Plasmodium malariae* en extendido

Dibujos: Glóbulo rojo: 7,5 cm de diámetro

1. **Trofozoitos jóvenes:** Se observan en forma de anillos con grueso punto cromático, rara vez doble. Llenan 1/4 a 1/3 del eritrocito.
2. **Trofozoitos medianos:** Núcleo redondo, alargado o en semicírculo. Citoplasma compacto, de forma redonda, angular u oval, de borde regular, rodeado de pequeña vacuola, a veces ausente. Frecuentemente el citoplasma tiene la forma de banda. Pigmento formado por gránulos gruesos de color marrón oscuro.
3. **Trofozoitos adultos:** El núcleo frecuentemente alargado. Citoplasma compacto, de contorno más irregular que en los trofozoitos medianos, de forma redondeada, oblonga, o en banda ancha. Los gránulos de pigmento son grandes y oscuros, con tendencia a agruparse en la periferia. Llena o casi llena el eritrocito.
4. **Esquizontes presegmentados:** Se observa el citoplasma compacto, núcleo dividido en varias masas cromáticas de formas irregulares. Pigmento con tendencia a agruparse.
5. **Esquizontes maduros:** Con 6 a 12 merozoitos, generalmente 8 a 10 agrupados con cierta frecuencia como los pétalos de una margarita o irregularmente. Pigmento central agrupado en masa. Llena casi completamente el eritrocito.
6. **Macrogametocitos:** Núcleo compacto, pequeño, de color rojo oscuro y excéntrico. Citoplasma de contorno circular u ovoide. El pigmento es grueso, abundante de color marrón oscuro distribuido en el citoplasma. Generalmente llenan el eritrocito.
7. **Microgametocitos:** Núcleo difuso, situado en el centro del parásito. Citoplasma coloreado de rosado pálido. Pigmento de color marrón oscuro, distribuido en el citoplasma. Casi llena el eritrocito.

Plasmodium malariae Blood Stage Parasites, Thin Blood Smears

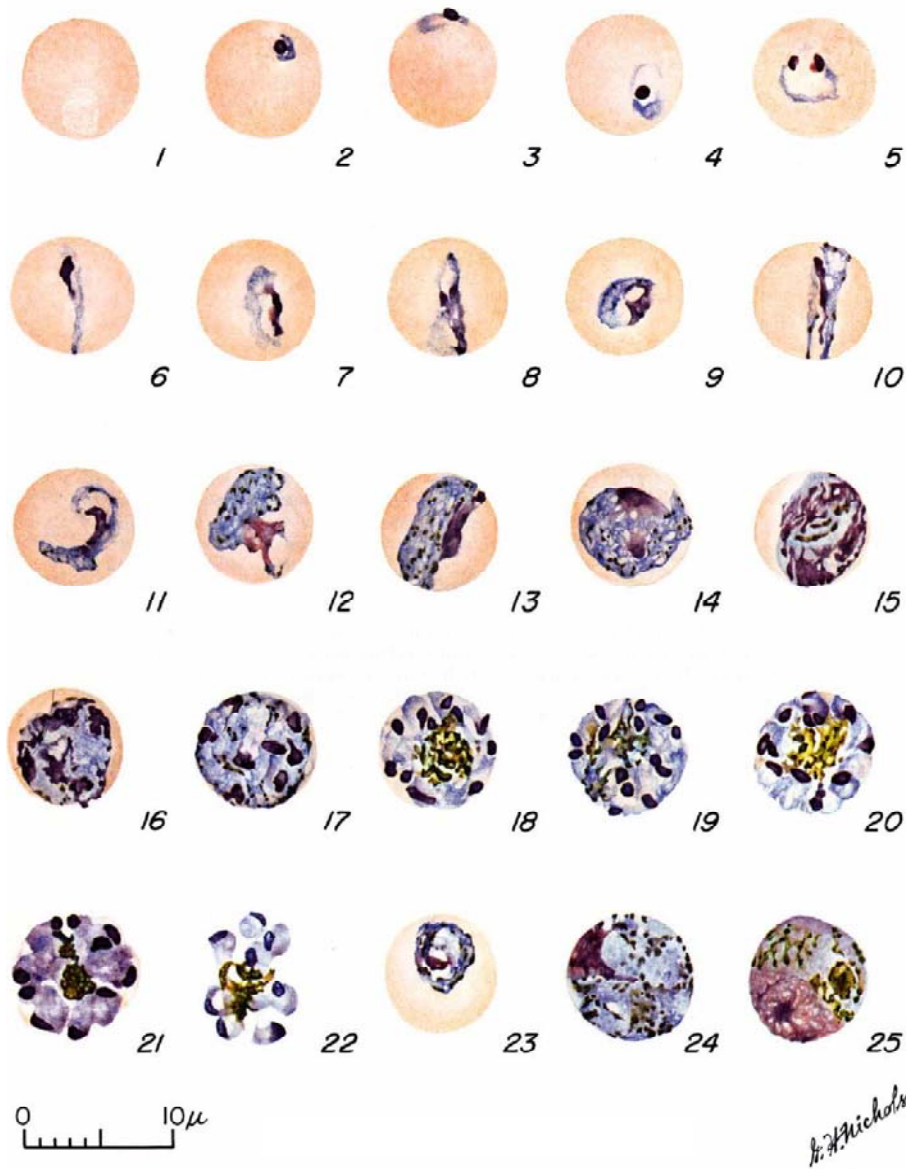


Fig. 1: Normal red cell **Fig. 23:** Developing gametocyte **Figs. 2-5:** Young trophozoites (rings) **Fig. 24:** Macrogametocyte (female) **Figs. 6-13:** Trophozoites **Fig. 25:** Microgametocyte (male) **Figs. 14-22:** Schizonts

Estudio de *Plasmodium malariae* en gota gruesa.

1. **Trofozoitos jóvenes:** Se observan en forma de anillos o comas. Citoplasma denso, con núcleo compacto y bien visible.
2. **Trofozoitos medianos:** Anillos de mayor tamaño que los de la fase anterior. Masa citoplásmica densa y redondeada. Abundante pigmento oscuro que llena el citoplasma del parásito, ocultando con frecuencia el núcleo compacto y de forma redondeada.
3. **Trofozoitos adultos:** De forma redondeada u oval, de tamaño mayor que en la fase anterior. Citoplasma con abundante pigmento oscuro que llena al parásito. A veces se observa el parásito (núcleo y citoplasma) en forma de banda y el pigmento distribuido en la periferia del parásito.
4. **Esquizontes presegmentados:** Citoplasma con pocos núcleos de apariencia irregular. Pigmento bien distribuido y agrupado en masas.
5. **Esquizontes segmentados:** Con aproximadamente ocho merozoitos, claramente separados. Con frecuencia sólo se observan los núcleos de los merozoitos, sin ser visible el citoplasma, y los gránulos de pigmento agrupados en una masa central. El reducido número de núcleos, la abundancia y ubicación central del pigmento contribuyen a facilitar el diagnóstico de la especie en este estadio.
6. **Macrogametocitos:** El núcleo es compacto, pequeño, de color rojo, situado hacia la periferia del parásito y el citoplasma se observa denso. El pigmento es abundante de color marrón oscuro y grueso, distribuido en el citoplasma.
7. **Microgametocitos:** Núcleo central, difuso, de color rosado. Pigmento en forma de gránulos de color marrón oscuro distribuidos en el escaso citoplasma del parásito.



***Plasmodium malariae* Blood Stage Parasites, Thick Blood Smears**

- 1: Small trophozoites.
- 2: Growing trophozoites.
- 3: Mature trophozoites.
- 4, 5, 6: Immature schizonts with varying numbers of divisions of the chromatin.
- 7: Mature schizonts.
- 8: Nucleus of leucocyte.
- 9: Blood platelets.
- 10: Cellular remains of young erythrocytes.

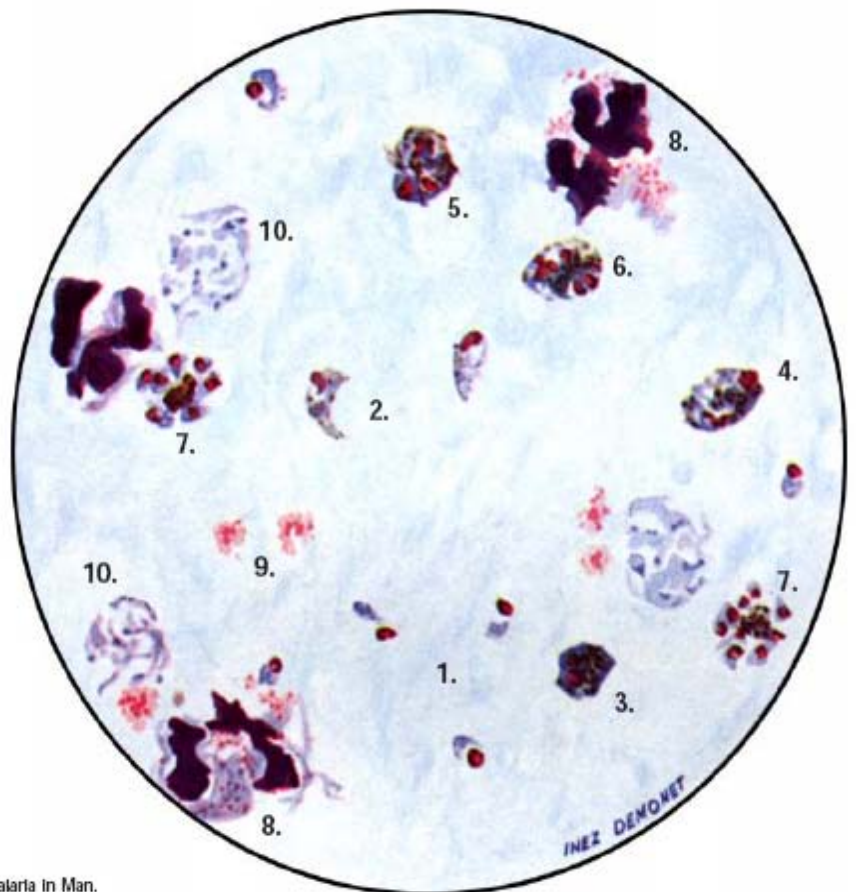


Illustration from: Wilcox A. Manual for the Microscopical Diagnosis of Malaria In Man. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, 1960.

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA

CONSIDERACIONES GENERALES

La determinación de la densidad parasitaria es útil para:

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

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA

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

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

Sistema indirecto, simple, usado rutinariamente que permite determinar el número de parásitos presentes por microlitro de sangre mediante la suma del total de parásitos observados en 100 campos.

El resultado se deberá informar de la siguiente manera:

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

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

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

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

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

Método práctico, razonable y de precisión aceptable. El número de parásitos por microlitro de sangre se mide comparando el número de parásitos asexuados con el número de leucocitos en la gota gruesa en base a un recuento medio estimado en cerca de 6000 leucocitos por microlitro de sangre.

Aunque existen variaciones este número nos permite comparaciones razonables, particularmente cuando se comparan densidades de muestras obtenidas sucesivamente del mismo paciente.

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

Aplicar los siguientes criterios, según se presente el caso:

1. Si después de contar 200 leucocitos, 10 ó más parásitos han sido identificados y contados, anotar los resultados en los formatos de registro en términos de número de parásitos por 200 leucocitos.
2. Si después de contar 200 leucocitos, menos de 10 parásitos han sido identificados y contados, continuar el recuento de leucocitos hasta llegar a 500 leucocitos, para luego anotar los resultados en los formatos de registro en términos de número de parásitos por 500 leucocitos.
3. En caso de parasitemia alta, realizar el recuento en función del número de parásitos, registrando su recuento hasta 500 y reemplazar su valor en la fórmula con la cantidad de leucocitos encontrados.
4. En cada caso, el número relativo de parásitos al número de leucocitos contados puede ser convertido a parásitos por microlitro de sangre usando la siguiente fórmula:

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

Donde:

N° de parásitos = Número de parásitos contados.

N° de leucocitos = Número de leucocitos contados.

μL = microlitro

Ejemplos:

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

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

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

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

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

$$\text{Parásitos/ } \mu\text{L} = \frac{501 \times 6000}{95} = 31.642$$

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

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

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

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

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

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

T= trofozoitos únicamente

T y G= trofozoitos y gametocitos

G= gametocitos únicamente

Cuando se detecta un caso positivo de malaria por *P. falciparum*, se debe reportar inmediatamente al jefe inmediato y realizar un seguimiento o control tomando muestras durante los días D3, D7 y D14.

En caso de realizar la evaluación de alguna droga antimalárica, el seguimiento de los pacientes se realizará los días D1, D2, D3, D7, D14, D21 y D28.

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

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

Ejemplo:

Clave original
(201) 15

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

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

CONTROL DE CALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE MALARIA

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

Calidad óptima de la toma de muestra

De la gota gruesa

- Ubicación : 1 a 1,5 cm. del tercio externo de la lámina
- Tamaño : 1,5 cm. de diámetro aproximadamente
- Cantidad de sangre: 15 a 20 mm³
- Calidad : 10 a 20 leucocitos por campo

Del extendido

- Tamaño : 3 cm. de largo y 2 cm. de ancho
- Ubicación : Del centro al borde externo de la lámina
- Cantidad de sangre: 5 mm³
- Extendido : Fino, con cabeza, cuerpo y cola
- Identificación : Legible (fecha y número).

Calidad óptima de la coloración

De la gota gruesa

DESHEMOGLOBINIZACIÓN	Fondo libre de glóbulos rojos.
TONALIDAD	<p>Coloración del parásito: Núcleo: rojo grosella Citoplasma: azul cielo. Pigmento: marrón amarillento</p> <p>Coloración de leucocitos: Linfocitos: Citoplasma basófilo azul cielo Núcleo: azul oscuro o violeta intenso. Monocitos: Citoplasma azul grisáceo. Núcleo: azul oscuro Neutrófilo: Citoplasma rosado. Núcleo: púrpura. Granulaciones rojizas, finas y numerosas. Eosinófilos: Citoplasma rosado. Gránulos gruesos, rojo moreno a cobrizo. Basófilos: citoplasma y núcleo color azul. Granulaciones burdas (gruesas) Raramente se observan.</p>
PRECIPITADO	Ausencia de precipitado de colorante

Del extendido

Glóbulos rojos: color rosado o grisáceo.

Glóbulos blancos y plaquetas: deben conservar la morfología característica.

Parásitos maláricos: citoplasma azulado, núcleo rojo y pigmento marrón amarillento.

Calidad del diagnóstico

La reproducibilidad diagnóstica se determinará revisando y confrontando el diagnóstico emitido por el laboratorio a ser evaluado.

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

DIAGNÓSTICO	CONTROL DE CALIDAD	ERROR
Positivo	Negativo	N x P (falso positivo)
Negativo	Positivo	P x N (falso negativo)

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

Evaluación

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

BIBLIOGRAFÍA

- C.D.C. Center for Diseases Control & Prevention; National Center for Infections Disease – Division of Parasitic Disease; Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern
- El Microscopio. (2006) Breve historia del Microscopio. Documento en línea. Disponible: www.danival.org/notasmicro/madre_micro.html, www.microbiologia.com.ar/microscopia/index.html. [Consultado el: 1 julio, 2006].
- Escuela de Malariología. (2000). Guías prácticas del Curso Internacional de Malaria y Saneamiento Ambiental. Editado por el Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Maracay. Venezuela.
- Malaria. (2006) Ministerio de Salud de Costa Rica. Documento en línea. Disponible: www.netsalud.sa.cr/estadist/enferme/paluO1.htm. . [Consultado el: 5 junio, 2006].
- Mendoza, Luís (2006). La sangre. Monografías.com. Documento en línea. Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos/sangre/sangre.shtml>, [Consultado el: 6 junio, 2006].
- Ministerio de Salud. Perú. (2003). Manual de Procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Serie de Normas Técnicas N° 39. Lima: MINSA.
- Organización Mundial de la Salud. (1998). Diagnóstico de Malaria. Publicación Científica N° 512.
- Yale Medical Group. (2006). Hematología y los trastornos de la sangre. Descripción general de la sangre y sus componentes. Documento en línea. Disponible en: www.ymghealthinfo.org/content.asp?pageid=P05425. [Consultado el: 6 junio, 2006].

ANEXOS

ANEXO A

BIOSEGURIDAD

La Bioseguridad es un conjunto de medidas preventivas para proteger la salud, seguridad humana y del medio ambiente frente a los diferentes riesgos producidos por agentes biológicos, físicos, químicos o mecánicos.

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Trabajar en un laboratorio aumenta el riesgo de enfermarse por la exposición a los agentes biológicos, sea a través de accidentes con agujas o materiales cortopunzantes contaminados, aerosoles, manejo de material contaminado o por falta de vacunación.

El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico de malaria debe practicar diariamente y no debe olvidar aplicar las medidas de bioseguridad.

Se deben controlar las medidas necesarias aplicables a:

- El personal.
- La vestimenta.
- Los ambientes.
- La obtención de muestras y el envío de muestras al laboratorio.
- Los casos de accidentes.
- El laboratorio.

MEDIDAS DE PROTECCIÓN

DEL PERSONAL

- Usar batas de laboratorio con manga larga, guante, mascarilla, anteojos de protección, según los requerimientos de cada procedimiento.
- Lavarse las manos cada vez que sea necesario.
- Cubrir cualquier corte o abrasión de las manos con adhesivos.
- Todo personal de laboratorio debe recibir inmunización protectora, según la naturaleza de sus funciones, contra tétanos, difteria, hepatitis viral B, etc.
- Cuidar de punzarse con cualquier instrumento agudo que haya estado en contacto con sangre.
- No fumar en el área de laboratorio.
- No ingerir bebidas, alimentos, ni aplicarse cosméticos en el área del laboratorio.



DEL AMBIENTE

- El ambiente del laboratorio debe estar equipado con mesón realizado en material resistente a los ácidos y álcalis, fregadero con agua potable, electricidad, ventanas, aire acondicionado, puertas, buena iluminación, equipos y materiales necesarios para el buen funcionamiento.
- Mantener las puertas del laboratorio cerradas y no permitir la entrada de niños en las zonas de trabajo del laboratorio.
- El laboratorio debe mantenerse limpio y aseado, retirando cualquier material que no tenga relación con el trabajo. Los pisos deben limpiarse con soluciones desinfectantes. No se debe barrer el piso en seco, ni encerar.
- Deberá haber un programa de lucha contra insectos y roedores.
- En caso de accidentes por derrame de una muestra en el piso o mesón, cubrir con periódico y empaparlo cuidadosamente con fenol al 5% y dejar actuar durante 30 minutos como mínimo antes de limpiar el área.
- Se debe colocar extinguidores, que deben ser recargados anualmente.



Antes de retirarse del Laboratorio, hay que cerciorarse de que:

- Las llaves de agua y gas estén debidamente cerradas.
- Los aparatos eléctricos estén desconectados y estén funcionando bajo advertencia, los que deban permanecer conectados.
- Apagar el aire acondicionado y todas las luces.
- Cerrar puertas y ventanas.
- Dejar ordenado el mesón de trabajo.

DE LAS MUESTRAS Y SU PROCESAMIENTO

- Los objetos afilados y punzantes deben manejarse con sumo cuidado. Las lancetas utilizadas en la toma de muestra deben descartarse una vez usadas, en un recipiente con desinfectante y no se deben reutilizar.
- Cualquier material contaminado con sangre, deberá ser colocado en un envase con cloro o hipoclorito de sodio al 1%.
- Desinfectar, esterilizar o descartar adecuadamente los instrumentos después de usarlos.

Para cumplir con las medidas de Bioseguridad y evitar un posible contagio, las muestras de sangre serán procesadas como material altamente infeccioso.

ANEXO B

MICROSCOPIO COMPUESTO

El microscopio compuesto, que se ha hecho de uso general a partir de mediados del siglo XIX y que fue de importancia crucial para la evolución de la microbiología como ciencia, es todavía, con ciertas variaciones, el principal apoyo de la investigación rutinaria.

Este tipo de microscopio está formado básicamente por una parte mecánica y una parte óptica y es capaz de conseguir aumentos considerablemente mayores que el microscopio construido con una sola lente. Este último, llamado microscopio simple, se usa principalmente en el formato de lupa.

Los elementos mecánicos básicos son **el pie**, que es el soporte del microscopio, **la columna**, en la que se apoyan las restantes piezas, **el tubo**, que es el elemento de unión entre el ocular y **el revólver** (pieza giratoria que soporta los objetivos), **la platina**, sobre la que se apoya la preparación a observar, y **los tornillos Macrométrico y Micrométrico** que se utilizan para enfocar la preparación, el primero se utiliza para lograr la aproximación del enfoque y el segundo para conseguir un enfoque preciso y darle nitidez a la imagen.

En cuanto a la parte óptica, un microscopio compuesto tiene dos lentes o sistemas de lentes: **el objetivo**, situado cerca del objeto que se observa, proyecta una imagen ampliada del objeto observado en dirección **al ocular**, que está colocado cerca del ojo y actúa, a modo de lupa, ampliando la imagen que produce el objetivo, y **el condensador**, cuya misión es concentrar la luz sobre la preparación y permitir manipular su intensidad.

La ampliación total aportada por el conjunto objetivo-ocular es igual al producto de multiplicar la capacidad de aumento del objetivo por la del ocular; así: la mayor parte de los microscopios usados en microbiología tienen oculares de diez aumentos (abreviadamente, 10 X) y objetivos de aumentos diversos, habitualmente 10 X (aumento total, 100 X), 40 X (total, 400 X), y 90 X ó 100 X (objetivos de inmersión en aceite; 900 X ó 1000 X total).

Las lentes de menor aumento se utilizan para rastrear la preparación buscando objetos de interés, el objetivo de 40 aumentos permite la observación detallada de los microorganismos grandes tales como algas, protozoos y hongos, y los objetivos de 90 ó 100 aumentos se emplean para ver las bacterias y los pequeños microorganismos eucariotas.

Además del aumento, hay propiedades importantes de un microscopio como es: su **poder resolutivo**, que es la capacidad de mostrar distintos y separados dos puntos muy cercanos; y por tanto, cuanto mayor sea el poder resolutivo, mayor será la definición con que podremos observar un objeto. Los microscopios de gran poder resolutivo son especialmente buenos para ver pequeñas estructuras.

El **poder resolutivo** de un microscopio compuesto depende de la longitud de onda utilizada y de una propiedad óptica de la lente conocida como apertura numérica. Como la longitud de onda habitualmente está fijada, la resolución de un objeto es función de la apertura numérica;

cuanto mayor sea la apertura, el objeto resuelto será más pequeño. Hay una correspondencia aproximada entre el aumento de un objetivo y su apertura numérica, de tal modo que las lentes con mayores aumentos habitualmente tendrán mayores aperturas numéricas. (El valor de la apertura está marcado al lado de la lente).

El **poder de visibilidad**, es la capacidad de distinguir la presencia de un objeto; **poder de definición**, que es la facultad que tiene un objetivo de suministrar imágenes claras con contornos netos y depende de las correcciones cromáticas y de esfericidad y **poder de amplificación** que es la propiedad que tiene un objetivo de aumentar un objeto y se expresa en diámetros.

El sistema de iluminación de un microscopio es también de considerable importancia, especialmente cuando se utilizan grandes aumentos. La luz que entra en el sistema debe enfocarse sobre la preparación para que la imagen se traslade de forma adecuada al objetivo y llegue con la mayor calidad posible al ojo del observador a través del ocular. En los microscopios antiguos, la fuente de luz era externa, y se utilizaba un espejo, situado en el propio microscopio, para reflejar esa luz externa hacia la preparación y los objetivos. Actualmente se utiliza un sistema de lentes, incorporado al propio microscopio, llamado condensador. Elevando o bajando el condensador puede alterarse el plano del foco de la luz y elegirse una posición que consiga el foco preciso. El condensador tiene también un diafragma iris, que controla el diámetro del círculo de luz que pasa por el sistema.

Lo que se busca con este diafragma iris no es controlar la intensidad de la luz que alcanza el objeto, sino asegurar que la luz que pasa por el sistema condensador ocupe justamente el objetivo. Si el diafragma iris es demasiado grande, parte de la luz pasará no sólo al objetivo sino también alrededor de él, y no se utilizará. Si la luz es demasiado brillante, no deberá reducirse alterando la posición del condensador o del diafragma iris, sino usando filtros de neutralización, o disminuyendo el voltaje de la lámpara. **Nunca se insistirá lo suficiente en que el ajuste apropiado de la luz es crucial para la buena microscopía, especialmente a los mayores aumentos.**

Los tornillos macro/micrométrico están engarzados con la platina que soporta las muestras por medio de un mecanismo de cremallera y se utilizan para subir y bajar dicha platina (acercarla o alejarla del objetivo) con el fin de enfocar la imagen que se forma en el ocular. El tornillo macrométrico maneja un engranaje de paso largo, diseñado para efectuar movimientos de gran amplitud y largo recorrido, mientras el tornillo micrométrico controla un engranaje de paso corto, especial para movimientos de pequeña amplitud y pequeño recorrido y se utiliza para el enfoque fino de la imagen.

MANEJO DEL MICROSCOPIO

La posición del microscopista es muy importante, debe sentarse en posición cómoda sin esfuerzos musculares innecesarios, en especial en cuello y cintura, dando la sensación de que se está reposando y no trabajando.

Las operaciones del manejo del microscopio son las siguientes: iluminación, enfoque del objetivo, enfoque del condensador y uso del diafragma iris.

Iluminación

Debemos antes que nada preocuparnos de tener una buena fuente de luz (lámpara incorporada). La iluminación del campo microscópico se debe comenzar usando el objetivo de menor aumento, el de 10 X que da más amplitud de campo microscópico. Después de elegido en el campo la parte interesante debe examinarse con los objetivos de mayor aumento, el de 40 X y de 100 X, que dan una menor amplitud de campo microscópico.

Para los trabajos de campo, donde no contamos con luz eléctrica, la iluminación del campo microscópico se efectúa haciendo reflejar en el espejo la luz proveniente de las nubes blancas y no la luz solar directa, debido al resplandor. Para esta operación utilizaremos el espejo plano, pero si éste nos reflejara imágenes secundarias, tales como ramas de árboles, ventanas u otros objetos, se usará entonces el espejo cóncavo.

Enfoque del objetivo

Después de la iluminación del campo microscópico, con el tornillo macrométrico se acerca el objetivo al objeto a examinar. Esta operación se realiza subiendo la platina hasta su máxima capacidad, de modo que haga un suave contacto con la lámina o porta objeto, se observa por los oculares y se comienza a alejar el objetivo del objeto bajando la platina lentamente, hasta que aparezca la imagen en el campo microscópico; luego se completa el enfoque con el uso del tornillo micrométrico con delicados y cortos movimientos.

Debido a que estos objetivos están perfocalizados, una vez que se ha enfocado con un objetivo, se puede cambiar a otro y con una leve ayuda del tornillo micrométrico se efectúa el enfoque perfecto, sin necesidad de usar el tornillo macrométrico.

Enfoque del condensador

Por medio del tornillo de ajuste del condensador se hace el ascenso y descenso de éste, lentamente hasta completar el enfoque, debiendo estar el diafragma iris totalmente abierto.

La intensidad de la luz se logra mediante la fuente de iluminación, no subiendo y bajando el condensador porque es mala técnica microscópica.

Algunos de los microscopios actuales, vienen con el condensador fijo.

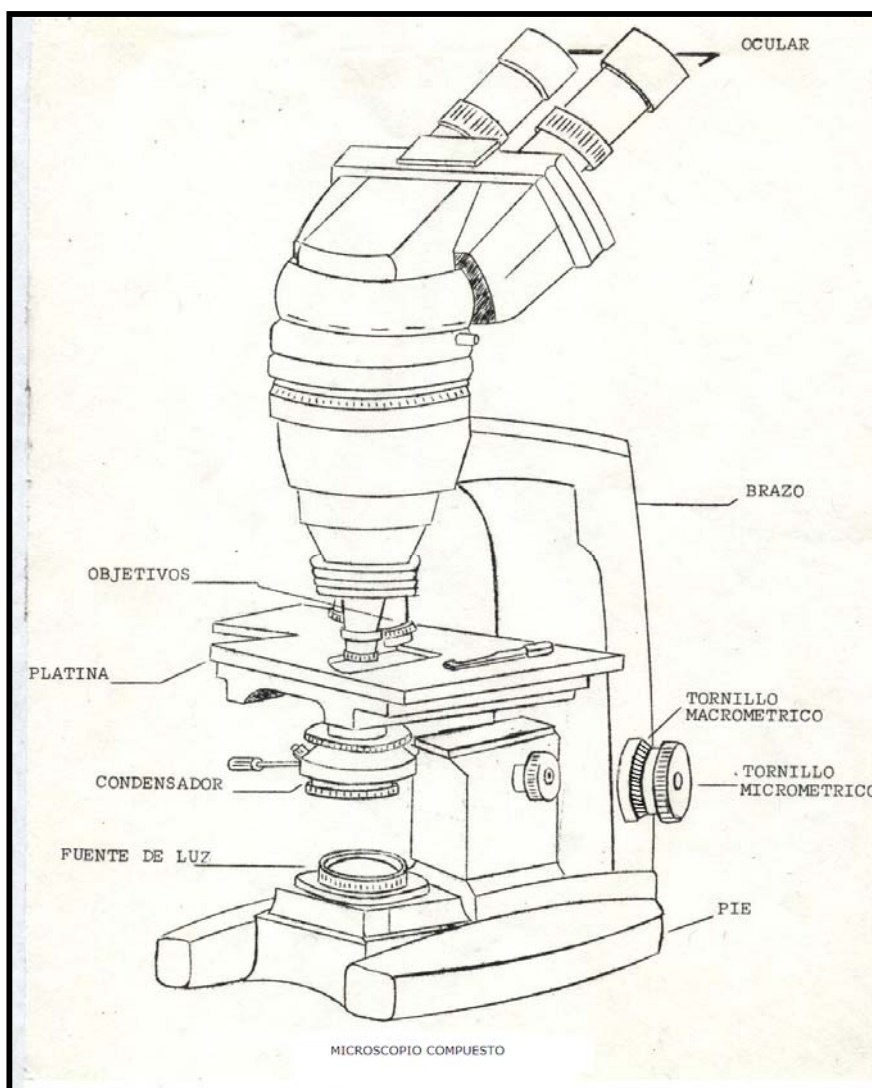
CUIDADO DEL MICROSCOPIO

- Cuando no se esté usando, debe guardarse en su caja correspondiente.
- Nunca tome el microscopio por el tubo con una mano para trasladarlo de un sitio a otro; utilice ambas manos una en el tubo y una en el pie.
- Evitar toda clase de golpes.
- Nunca deje el microscopio sin oculares, a menos que los orificios se taponen.
- Si no se está usando el microscopio, tener cuidado que el objetivo de menor aumento sea el que está colocado en línea con el tubo principal.
- Si los objetivos están colocados en el revólver-porta objetivos hay que tener también colocados los oculares, para evitar que el polvo entre por el tubo y se deposite en la lente superior del objetivo.
- Nunca toque los objetivos con los dedos.

- En los climas cálidos y húmedos, no guarde el microscopio en estuches de madera cerrados, es indispensable mantenerlos durante la noche en un armario provisto de bombillos o con bolsitas de Sílica Gel o cualquier antihumectante, para así evitar la proliferación de hongos que tanto perjudican al sistema óptico.

NORMAS DE MANTENIMIENTO DEL MICROSCOPIO COMPUESTO

- Protegerlo de la humedad para evitar los hongos.
- Quitar el polvo de los oculares con una perita de goma.
- Usar el papel limpia lentes para limpiar los objetivos, especialmente después que se ha usado el objetivo de inmersión.
- Limpiar la parte mecánica con un pañito.
- No usar xilol ni otra sustancia química para la limpieza de la parte óptica.



ANEXO C

LA SANGRE Y SUS COMPONENTES

Los parásitos maláricos se encuentran en la sangre invadiendo los eritrocitos, por lo tanto la persona que trabaja en la búsqueda de los plasmodios, debe conocer aspectos básicos de este líquido orgánico de composición, propiedades y funciones complejas. La hematología es, en principio, el estudio de los elementos celulares de la sangre.

La sangre humana está formada por una parte líquida denominada plasma y elementos celulares que incluyen eritrocitos, leucocitos y plaquetas. El adulto normal tiene alrededor de seis litros de este líquido vital, lo que constituye 7 a 8% del peso corporal total. El plasma representa aproximadamente el 55% del volumen sanguíneo, los eritrocitos el 45% y los leucocitos y plaquetas el 1%.

El plasma, es un líquido amarillento y turbio formado por agua, sales minerales, aminoácidos, enzimas, hidratos de carbono, anticuerpos, glucosa, proteínas (albúmina y globulinas), lípidos y hormonas, y en el cual se encuentran en suspensión las células sanguíneas: eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Las células sanguíneas se fabrican en la médula ósea que es el material esponjoso que se encuentra en el interior de los huesos y que produce aproximadamente el 95 % de las células sanguíneas del cuerpo. Existen otros órganos y sistemas en nuestro cuerpo que ayudan a regular las células sanguíneas. Los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado ayudan a regular la producción, destrucción y diferenciación de las células. El proceso de producción y desarrollo de nuevas células se denomina hematopoyesis.

Las células sanguíneas formadas en la médula ósea empiezan como células madres. La "célula madre" (o célula hematopoyética) es la fase inicial de todas las células de la sangre. A medida que la célula madre madura, se desarrollan varias células distintas, como los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas. Las células sanguíneas inmaduras también se denominan blastocitos. Algunos blastocitos permanecen en la médula ósea hasta que maduran y otros se desplazan a otras partes del cuerpo para convertirse en células sanguíneas funcionales y maduras.

ELEMENTOS FORMES O FIGURADOS

Glóbulos rojos o eritrocitos

Se forman en la médula roja de los huesos a partir de células denominadas eritroblastos, los cuales maduran y luego expulsan el núcleo y se convierten en eritrocitos para circular en el torrente sanguíneo.

Los eritrocitos tienen forma de discos bicóncavos aplanados de 7 a 8 micras de diámetro, la cantidad normal en el hombre es de 3.5 a 4.5 millones por cada milímetro cúbico de sangre. Su función es el transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos y retirar el bióxido de

carbono de éstos para llevarlo a los pulmones a través de una sustancia presente en los eritrocitos denominada hemoglobina, la cual está compuesta de un grupo hemo y de una proteína, la globina formada por 4 cadenas polipeptídicas, 2 cadenas alfa y 2 beta, cada una de las cuales está unida a un grupo hemo. El grupo hemo contiene un átomo de hierro divalente y es éste el que se combina en forma reversible con un átomo de oxígeno, formando la oxihemoglobina que es transportada a las células corporales por los glóbulos rojos.

La vida media del eritrocito es de 100 a 120 días; alrededor del 90% de la destrucción de los eritrocitos senescentes es extravascular y tiene lugar en los histiocitos (fagocitos) del bazo, hígado y médula ósea. El 10% restante se cataboliza dentro de los vasos con liberación de hemoglobina directamente al torrente circulatorio. (Dibujo: diámetro: 7,5 cm)

Leucocitos o glóbulos blancos

Algunos se forman en la médula roja, otros en el tejido linfático porque son de diferentes formas o tipos. Hay en la sangre cinco tipos, todos están provistos de núcleo; carecen de hemoglobina y son incoloros. Son menos numerosos que los glóbulos rojos, de 5.000 a 10.000 por milímetro cúbico de sangre.

Hay dos tipos de glóbulos blancos: **agranulocitos** que comprende linfocitos y monocitos, son producidos en el tejido linfático del bazo, el timo y los ganglios linfáticos; y **granulocitos** que comprende los segmentados neutrófilos, eosinófilos y basófilos, que son producidos en la médula ósea junto con los glóbulos rojos. Los tres contienen gránulos citoplásmicos que difieren en tamaño y propiedades tintoriales.

La principal función de los glóbulos blancos es proteger al individuo contra los microorganismos patógenos por medio del fenómeno de fagocitosis, Los neutrófilos y monocitos intervienen en la defensa celular y los linfocitos en la defensa humoral del organismo.

Los leucocitos están dotados de mecanismos y propiedades que facilitan sus funciones específicas:

- Fagocitaria: a través la cual ingiere y digiere partículas extrañas, bacterias, células debido a la acción de enzimas digestivas secretadas por el mismo glóbulo..
- Quimiotáctica: es la atracción específica de los leucocitos hacia los sitios del organismo en donde se precisa su función fagocitaria.
- Migratoria: es la propiedad de movilización por medio de seudópodos y flexibilidad del cuerpo celular de los leucocitos a través de los tejidos y paredes vasculares (diapédesis).
- Secretoria: secretan enzimas y producen fermentos: proteasas, lipasa, amilasa, fosfatasas, oxidasas, contenidas en los gránulos, que son los lisosomas de los glóbulos blancos.
- Antigénica: propiedad de formar anticuerpos que constituyen los elementos de la defensa humoral del organismo.
- Plástica: propiedad de “modelar”, interviniendo en la formación o regeneración de los tejidos y de transformarse en otras células.

Granulocitos

Son células de núcleo polilobulado y citoplasma granuloso. El tiempo de vida media es de 5 a 6 horas en sangre periférica. Comprende tres variedades que se describen a continuación.

Segmentados neutrófilos

Constituyen la mayor parte de leucocitos circulantes y los valores normales son de 60 a 70%. Tienen un tamaño de 12 a 15 μ . Se caracterizan por presentar en su citoplasma granulaciones finas y abundantes que se tiñen de color violeta con Giemsa. El núcleo es segmentado con 2 a 4 lóbulos conectados por un filamento nuclear delgado. La cromatina se condensa y se tiñe de color púrpura intenso. Realizan funciones fagocitarias. (Dibujo: Diámetro: 10,0 μ)

Eosinófilos

Miden entre 12 y 17 μ , y se encuentran en sangre periférica en cantidad de 1 a 3 %. El citoplasma tiene granulaciones gruesas, menos numerosas que las del neutrófilo, de color rojo pardo o anaranjado, el núcleo es bilobulado. Tienen una función “antitóxica”, gracias a la cual eliminan y neutralizan los productos tóxicos del metabolismo proteico o las exotoxinas liberadas por los parásitos hísticos o intestinales. Se sostiene que tienen una función antigénica, por su intervención en las reacciones inmunológicas de la alergia.

(Dibujo: Diámetro: 12,0 μ)

Basófilos

De tamaño entre 10 a 14 μ de diámetro, y los valores normales son 0 a 1%. El citoplasma contiene granulaciones de color azul oscuro, muy gruesas y escasas que cubren prácticamente al núcleo no lobulado y formado por cromatina muy densa. Se presentan en los focos inflamatorios facilitando los procesos de reabsorción, por contener heparina en sus granulaciones, impidiendo la formación de coágulos que retardan la cicatrización.

Agranulocitos

Comprende los linfocitos y los monocitos. Son células de núcleo no lobulado, sin granulaciones y el tiempo de vida biológico es de 32 horas, 5 días o varios meses.

Linfocitos

Presenta variación en tamaño, que depende de la cantidad de citoplasma presente, el linfocito pequeño mide de 7 a 10 μ y constituye la mayor parte, los linfocitos grandes son heterogéneos y su tamaño varía de 11 a 16 μ . El citoplasma es de color azul celeste. La cromatina está muy condensada y se tiñe de color púrpura intenso. Los valores normales son entre 20 a 40%. Intervienen en la función de defensa humoral (inmunológica) de la sangre. El timo origina las células o linfocitos “T” de función inmunitaria celular, el linfocito “B” deriva de la médula ósea e intervienen en la inmunidad humoral o producción de anticuerpos (inmunoglobulinas). (Dibujo: Diámetro: 8,0 μ)

Monocitos

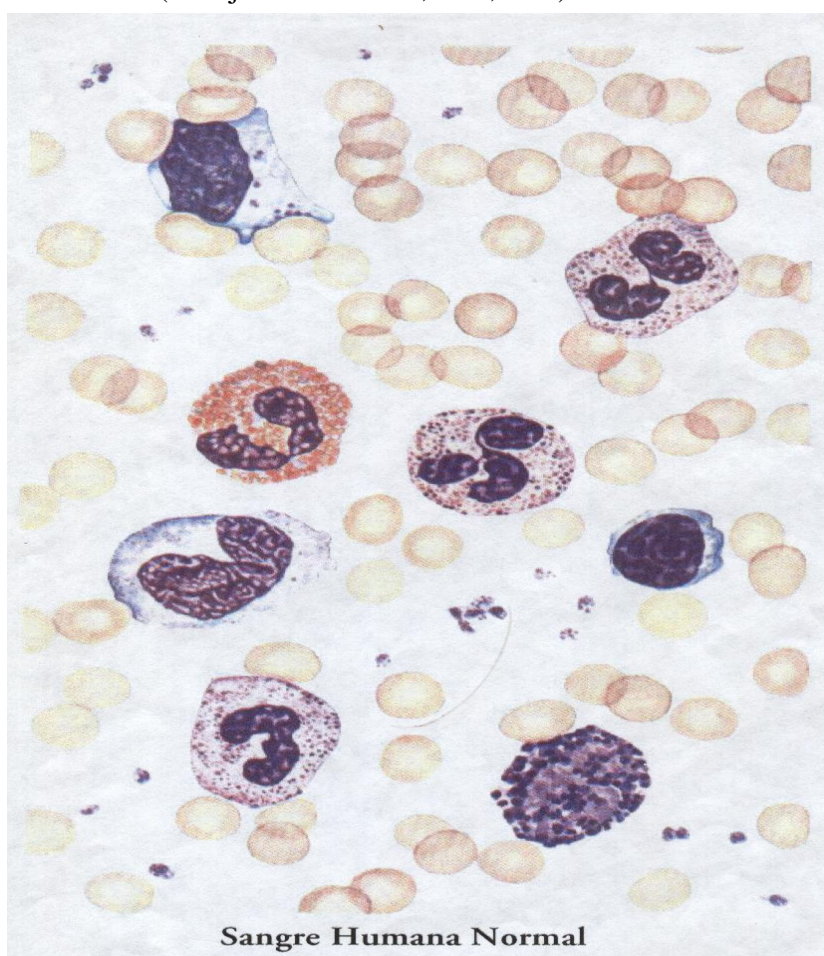
Citoplasma de color azul grisáceo. Núcleo irregular y con frecuencia semeja una herradura o un frijol, la cromatina es laxa. Tamaño entre 10 a 30 μ con promedio de 18 μ , siendo las células de mayor tamaño en la sangre periférica y los valores normales son de 3 a 7 %. Tienen propiedades fagocitarias. (Dibujo: Diámetro: 15,0cm)

Plaquetas o trombocitos

Se originan a partir de una célula gigante denominada megacariocito. Intervienen en la coagulación sanguínea formando el tapón plaquetario. La cantidad normal es de 150.000 a 400.000 por milímetro cúbico de sangre. El tiempo de vida media es de 6 a 7 días.

Están formadas por una masa central granular (cromómero) que se colorea débilmente con colorantes básicos y una zona hialina periférica (hialómero).

En anfibios, aves, peces y reptiles, los trombocitos presentan núcleo, mientras que en los mamíferos carecen de él. (Dibujo: Diámetro: 1,0 a 2,0 cm)



Sangre Humana Normal

ANEXO D

LIMPIEZA Y ALMACENAJE DE LAMINAS PORTAOBJETO

Recomendaciones

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

LIMPIEZA DE LÁMINAS NUEVAS

1. Lavar las láminas con detergente (remojuándolas durante 30 minutos en agua con detergente).
2. Enjuagarlas con agua a "chorro continuo", o cambiando el agua varias veces si se enjuagan en un recipiente.
3. Utilizar una esponja para lavar cada lámina en forma individual, secarla luego con un trozo de tela de algodón limpia.

LIMPIEZA DE LÁMINAS USADAS

1. Sumergir las láminas por 60 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (lejía) antes de lavarlas.
2. Lavarlas, una por una, con agua jabonosa caliente y frotar ambas caras con un cepillo.
3. Limpiar, uno por uno, con una gasa o torunda de algodón.
4. Séquelas con un paño limpio de algodón.
5. Los portaobjetos ligeramente rayados, inservibles para las extensiones sanguíneas, pueden aprovecharse en otros laboratorios.

ALMACENAMIENTO

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

ANEXO E

COLORANTE GIEMSA

El colorante que se utiliza en la técnica de diagnóstico parasitológico es el Giemsa, que es uno de los derivados del método original de Romanowsky, quien logra ver por primera vez en frotis sanguíneos, la coloración de núcleo de los parásitos maláricos demostrando que es un método de coloración diferencial con el cual el núcleo se coloreaba de rojo y el citoplasma de azul. Esta coloración diferencial de la cromatina nuclear se conoce como **“Efecto Romanowsky”**.

El colorante original de Romanowsky es una mezcla de dos soluciones acuosas: una del colorante básico azul metileno y sus derivados y la segunda una solución del colorante ácido eosina, las dos se mezclan y se usan inmediatamente.

El azul de metileno solo es un colorante pobre y la eosina también, pero si se mezclan se modifica su acción sobre todo si ésta se hace en un medio ligeramente alcalino. Es decir, hay una acción dual de la eosina y de los componentes presentes en el azul de metileno oxidados, al cual se le ha dado el nombre de azures.

Los azures son productos de oxidación del azul de metileno, que se forma por el reemplazamiento del grupo CH₃ de la molécula por un átomo de Hidrógeno.

Los azures más importantes son el azur “A” y el azur “B”. La coloración de azures del azul de metileno se denomina policromía.

Con el descubrimiento de Romanowsky se iniciaron las coloraciones policromas, de importancia en los exámenes y estudios microscópicos, tanto hematológico como parasitológico. Tradicionalmente se había observado que no siempre, la coloración daba los mismos resultados y era que desconocían los principios fundamentales de dicha coloración. Fue más tarde que se descubrió que el efecto Romanowsky se debía a una sustancia denominada azul de metileno.

En 1902, Gustavo Giemsa, adoptó un procedimiento surgido por Jennes, que consistía en recoger los precipitados que se forman cuando se mezclan las dos soluciones de azul de metileno y eosina, y lo redisolvió en metanol y glicerina.

Esta solución metanólica ionizada cuando se agrega agua, tiene las mismas propiedades que la coloración de Romanowsky.

Giemsa logró preparar por un procedimiento secreto con el azur de metileno y lo llamó “azur I”.

La fórmula original del colorante Giemsa es la siguiente:

Azur II.	0,8 grs
Azur II eosina (eosinato de azur II).....	3 grs
Glicerina	200 ml
Alcohol metílico	200 ml

Explicamos ahora la función de cada una de las sustancias que entran en la composición de Giemsa

Azur II.

1. Facilita la acción del eosinato del azur II, pues sin su presencia la coloración no es nítida.
2. Evita la precipitación del azur I - eosina al diluir el colorante de Giemsa en el agua destilada.

Azur II eosina:

Es el eosinato de azur de metileno puro, al que se debe la coloración metacromática. Es el colorante fundamental de Giemsa.

Alcohol metílico o metanol:

Es la sustancia disolvente de los colorantes.

Glicerina:

Aumenta el poder disolvente del alcohol metílico sobre los colorantes Azur II-eosina y Azur II, además evita la evaporación de metanol. Es decir que no debe utilizarse otro colorante que no sea el de Giemsa o derivado de Romanowsky.

NORMAS PARA LA CONSERVACION DEL COLORANTE GIEMSA

1. Guardarlo en un frasco de color ámbar
2. Protegerlo de la luz y del calor.
3. No agitarlo bruscamente.
4. No introducirle goteros y pipetas, sucios ni mojados.
5. Protegerlo de la humedad.

ANEXO F

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución Buffer pH 7.2

Fórmula

Fosfato de Sodio di-básico hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....	1.140 grs
Fosfato de Potasio monobásico (KH_2PO_4).....	0.448 grs
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

Solución Buffer pH 6.8

Fórmula

Fosfato de Sodio di-básico (Na_2HPO_4).....	3.45 grs
Fosfato de Sodio monobásico ($\text{Na}_2\text{KH}_2\text{PO}_4$).....	3.55 grs
Azida de Sodio (NaN_3).....	0.02 grs
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

ANEXO G



DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD AMBIENTAL

ENCUESTA DE MALARIA No. _____

Lugar donde se tomó la lámina _____ Fecha _____ Municipio _____
 Estado _____ Fecha examen de la lámina _____ Fecha de la Encuesta _____
 Nombre y apellido del enfermo _____ Lugar de Nacimiento _____
 Edad _____ años, o edad en meses _____ (si es menor del año) Género _____ Etnia _____
 Religión _____ Grado de Instrucción _____
 Ocupación _____ Edad Gestacional (semanas) en pacientes embarazadas _____
 Dirección donde encontrar al enfermo: lugar _____ Parroquia _____
 Municipio _____ Estado _____ Jefe de la Casa _____
 ¿Cuándo empezó la fiebre? _____ Lugar donde estaba cuando le empezó la fiebre _____
 _____ Municipio _____ Estado _____
 ¿Cuánto tiempo tenía viviendo en el lugar donde le empezó esta fiebre? _____
 ¿Había tenido antes fiebres parecidas? _____ ¿Cuándo? _____ ¿Dónde? _____
 _____ Municipio _____ Estado _____
 ¿Qué lugares ha visitado durante los últimos 6 meses? _____

FECHAS DE LAS SALIDAS	LUGARES EN LOS QUE PERMANECIO	PARROQUIA	MUNICIPIO	ESTADO	TIEMPO DE PERMANENCIA EN CADA LUGAR	¿PRESENTO FIEBRE?

¿Se enfermó después de regresar de alguno de estos lugares? _____ ¿De cual (es) Lugar (es)? : _____
 _____ ¿A cuántos días del regreso? _____ ¿Estuvo Hospitalizado? _____
 ¿Le han practicado transfusiones de sangre? _____ Fecha _____ Lugar _____
 Si fue examinado por el médico: ¿el bazo es palpable? _____

Marca de la lámina _____ Resultado _____ <input type="checkbox"/> Primo Infección <input type="checkbox"/> Recaída ORIGEN MÁS PROBABLE DE LA INFECCIÓN: LUGAR _____ PARROQUIA _____ MUNICIPIO _____ Edo. _____	CLASIFICACIÓN DEL CASO <input type="checkbox"/> AUTOCTONO <input type="checkbox"/> RECURRENTE <input type="checkbox"/> INDUCIDO <input type="checkbox"/> CRIPTICO <input type="checkbox"/> INTRODUCIDO CON SEMILLA DEL PAIS <input type="checkbox"/> INTRODUCIDO CON SEMILLA DEL EXTERIOR <input type="checkbox"/> IMPORTADO DEL EXTERIOR <input type="checkbox"/> IMPORTADO DE OTRO ESTADO
---	---

Actualización en el Diagnóstico Parasitológico de Malaria

MANIFESTACIONES CLINICAS INICIALES:

Fiebre _____ Escalofrío _____ Dolor de cabeza _____ Dolor abdominal _____ Vómito _____ Diarrea _____
 Náuseas _____ Debilidad _____ Fatiga _____ Inapetencia _____ Color de la orina _____
 Otros: _____

TRATAMIENTO: (DOSIS TOTAL / kg - Peso)

CLOROQUINA: _____ Mgs. N° de Tabletas: _____
 PRIMAQUINA: _____ Mgs. N° de Comprimidos: _____

OTROS MEDICAMENTOS: _____

REACCIONES ADVERSAS AL TRATAMIENTO:

Gastrointestinales: _____ Neurológicas: _____
 Cutáneas: _____ OTRAS: _____

EVOLUCION PARASITOLOGICA (Seguimiento del caso confirmado). Lámina tomada el 28vo día Posterior al último día de toma de medicamento:

FECHA	Lámina Control N°	Resultado		Especie parasitaria			
		Negativo	Positivo	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malariae</i>	<i>Infección Mixta</i>

(En caso de positividad, indicar formas parasitarias: T=trofozoitos; G=gametocitos)

EVOLUCION DEL PACIENTE:

DIAS DE TRATAMIENTO CUMPLIDOS: _____
 CURACIÓN _____ SI NO CURÓ ¿POR QUÉ? _____

OBSERVACIONES: _____

ELABORADO POR: (ESCRIBIR EN LETRA IMPRENTA).

NOMBRE Y APELLIDO: _____ C.I. _____

CARGO: _____

ANEXO H



LABORATORIO DE MALARIA ENVÍO DE LÁMINAS DE CONTROL

Zona_____ Demarcación_____ Municipio_____ Parroquia_____ Estado_____

Recolectadas por_____ Examinadas por_____

Coloreadas por_____ Enviadas por_____

Correspondientes al mes de_____ Año_____

Centro Poblado	Marca de las Láminas	<i>P. falciparum</i>		<i>P. vivax</i>		<i>P. malariae</i>		Negativa
		T	G	T	G	T	G	

Positivas:_____ Negativas:_____ Total láminas:_____

Lugar y fecha de envío: _____ Inspector de Demarcación:_____