

MANUAL OPERATIVO PARA EL DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE PALUDISMO

Ministerio de Salud

Secretaría de Promoción de la Salud, Prevención y Control de Riesgos

Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades Comunicables e Inmunoprevenibles

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas

Departamento de Parasitología

**Buenos Aires- ARGENTINA
2018**

AUTORES

Silvana Carnevale

Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Buenos Aires.
Magister en Epidemiología, Gestión y Políticas de Salud por la Universidad Nacional de Lanús.
Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Biológicas.
Profesional del Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”.
Investigadora del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
Buenos Aires, Argentina.

Jorge Néstor Velásquez

Médico por la Universidad de Buenos Aires.
Especialista en Infectología por el Ministerio de Salud.
Especialista en Ciencias Microbiológicas por el Ministerio de Salud.
Magister en Administración Sanitaria por la Universidad Católica de Salta.
Doctor en Medicina por la Universidad de Buenos Aires
Jefe de Unidad de Internación del Hospital de Infecciosas “Dr. Francisco J. Muñiz”.
Buenos Aires, Argentina.

COLABORADORES

Lic. María Laura Pantano

Profesional del Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Lic. Osvaldo Germán Astudillo

Profesional del Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán” y del Hospital de Infecciosas “Dr. Francisco J. Muñiz”.

Técn. Marta Graciela Cabrera

Supervisora técnica del Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud “Dr. Carlos G. Malbrán”.

REVISORES

Dra. María de la Paz Adé

Programa Regional de Malaria. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).
Washington DC.

Dra. Tamara Mancero Bucheli

Enfermedades Transmisibles y Análisis de la Salud. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS).
Buenos Aires, Argentina.

Dra. Sandra Paola Paz Almendares

Laboratorio Supranacional del Programa Regional de Malaria de OPS/OMS.
Tegucigalpa, Honduras.

CONTENIDOS

	Página
INTRODUCCIÓN	1
	3
SECCIÓN I: EL PALUDISMO	
CAPÍTULO 1: ASPECTOS GENERALES DEL PALUDISMO	4
2.1. Taxonomía de <i>Plasmodium</i>	4
1.2. Ciclo biológico	5
1.3. Diagnóstico laboratorial	11
SECCIÓN II: LA MICROSCOPIA ÓPTICA	14
CAPÍTULO 2: PREPARACIÓN DE MUESTRAS HEMÁTICAS	15
2.1. Normas básicas de bioseguridad	15
2.2. Limpieza y almacenaje de portaobjetos	16
2.3. Toma de muestras por punción digital	18
CAPÍTULO 3: TINCIÓN DE MUESTRAS HEMÁTICAS	23
3.1. Normas básicas de bioseguridad	23
3.2. Tinción de Giemsa	23
CAPÍTULO 4: OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	27
4.1. Normas básicas de seguridad	27
4.2. Uso y mantenimiento del microscopio	27
4.3. Observación de muestras	34
4.4. Los componentes de la sangre	36

Diagnóstico laboratorial de paludismo

CAPÍTULO 5: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>PLASMODIUM</i>	39
5.1. Reconocimiento del parásito	39
5.2. Aspectos morfológicos según especies de <i>Plasmodium</i>	42
5.3. Diagnóstico diferencial	48
CAPÍTULO 6: DENSIDAD PARASITARIA	55
6.1. Fundamentos	55
6.2. Recuento de parásitos	56
CAPÍTULO 7: REGISTRO E INFORME DE RESULTADOS	59
7.1. Mantenimiento de registros	59
7.2. Reporte de resultados	60
7.3. Seguimiento de pacientes con paludismo	61
SECCIÓN III: TESTS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (TDR)	63
CAPÍTULO 8: ASPECTOS GENERALES DE LOS TDR	64
8.1. Fundamentos de utilización	64
8.2. Mecanismo de acción de los TDR	66
8.3. Formato de los TDR	68
CAPÍTULO 9: SELECCIÓN DE LOS TDR	71
9.1. Elección del TDR	71
9.2. Utilidad en Argentina	72
SECCIÓN IV: TÉCNICAS MOLECULARES	74
CAPÍTULO 10: FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA DE PCR	75
10.1. La reacción de PCR	75

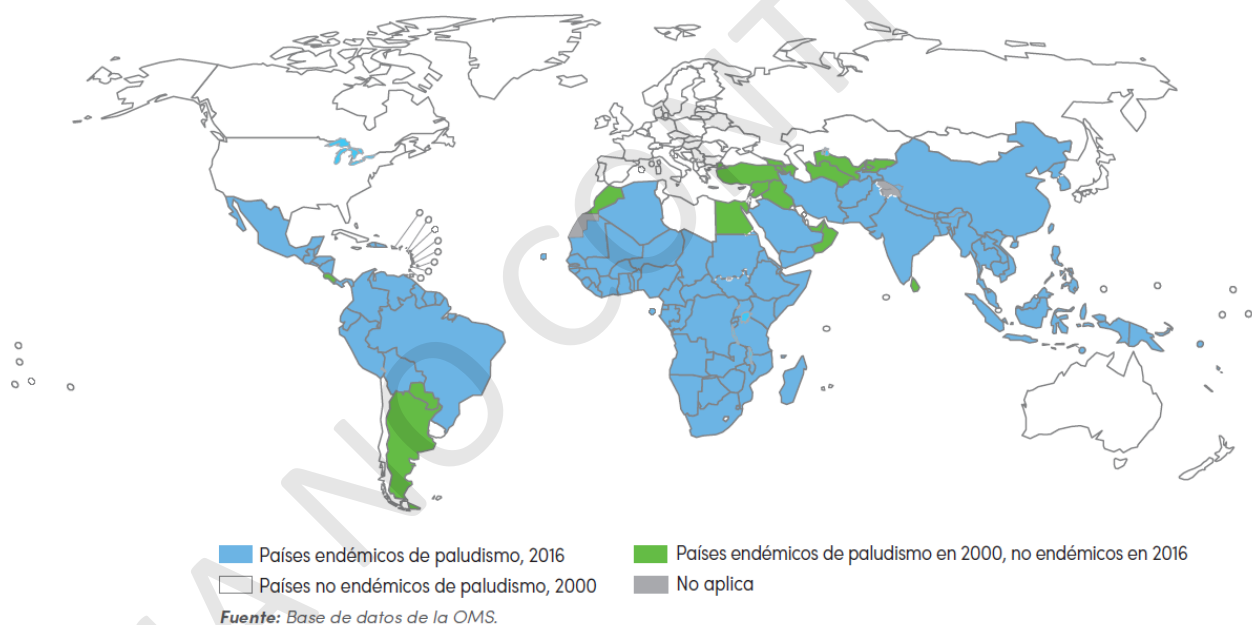
Diagnóstico laboratorial de paludismo

10.2. Componentes y optimización de la PCR	78
10.3. Contaminación en la PCR	82
10.4. Variaciones de la PCR	85
CAPÍTULO 11: IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES	90
11.1. Aplicaciones de las técnicas moleculares	90
11.2. Bioseguridad en biología molecular	92
CAPÍTULO 12: TOMA DE MUESTRAS PARA PCR	96
12.1. TOMA DE MUESTRAS en papel de filtro	96
12.2. Toma de muestras por venopuntura	99
CAPÍTULO 13: EXTRACCIÓN DE ADN	102
13.1. Extracción a partir de muestras en papel de filtro	102
13.2. Extracción a partir de sangre	107
CAPÍTULO 14: PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN	115
14.1. PCR para diagnóstico de <i>Plasmodium vivax</i>	115
14.2. PCR anidada para diagnóstico de <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> y <i>P. ovale</i>	119
14.3. PCR anidada para diagnóstico de <i>P. knowlesi</i>	126
14.4. PCR en tiempo real para diagnóstico de <i>P. falciparum</i> , <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> y <i>P. ovale</i>	131
CAPÍTULO 15: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	138
15.1. Fundamentos	138
15.2. Condiciones de seguridad	140
15.3. Protocolo de trabajo	140

SECCIÓN V: ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO	147
CAPÍTULO 16: SISTEMA NACIONAL DE LABORATORIOS DE REFERENCIA Y REDES DE LABORATORIO (SNLRR)	148
16.1. Funcionamiento del Sistema	148
16.2. Funciones específicas según niveles	151
CAPÍTULO 17: CONTROL DE CALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE PALUDISMO	154
17.1. Revisión de láminas diagnosticadas	154
17.2. Evaluación externa del desempeño	158
17.3. Capacitación	166
17.4. Supervisión	167
17.5. Responsabilidades en el aseguramiento de la calidad	169
SECCIÓN VI: BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	170
CAPÍTULO 18: DOCUMENTACION DE REFERENCIA	171
CAPÍTULO 19: ANEXOS	173
19.1. Gráficos auxiliares de OMS para diagnóstico de paludismo	174
19.2. Gráficos auxiliares de CDC para diagnóstico de paludismo	181
19.3. Láminas fotográficas auxiliares de CDC para diagnóstico de paludismo	190
19.4. Láminas fotográficas auxiliares para diagnóstico de diferencial	207

INTRODUCCIÓN

El paludismo o malaria es la enfermedad parasitaria tropical más importante, que causa la muerte de más personas que cualquier otra enfermedad notificable con excepción de la tuberculosis. Se calcula que para el año 2015 se presentaron 212 millones de nuevos casos de paludismo en el mundo y 429 000 muertes por paludismo. En el año 2016, el paludismo se consideró endémico en 91 países y territorios, frente a 108 países en el 2000.



Países endémicos de paludismo en 2000 y 2016 (Fuente: OMS, 2016).

El paludismo es una enfermedad curable si es diagnosticada rápidamente y tratada adecuadamente. Es producida por protozoarios coccidios del género *Plasmodium*. Las cuatro especies más comunes que infectan al hombre son: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*, de las cuales, las dos primeras, representan el 95% de las infecciones. También se han descrito infecciones humanas por *Plasmodium knowlesi*.

Su transmisión natural es mediante la picadura del mosquito *Anopheles* hembra. Además esta enfermedad parasitaria puede presentar transmisión congénita o transfusional.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

La situación epidemiológica actual permite que Argentina se encuentre en proceso de certificación como país libre de paludismo, con actividades destinadas a la prevención de la reintroducción y restablecimiento del mismo. La distribución del vector y la presencia de casos importados por personas que residen o que viajaron a países endémicos, representan un riesgo para la reintroducción de esta enfermedad, para lo cual se necesita un sistema de vigilancia constante, donde la clave es el diagnóstico certero y precoz, para la posterior administración de un tratamiento eficaz, oportuno y que permita la implementación de las medidas de control que se consideren necesarias.

La microscopía óptica o los Tests de Diagnóstico Rápido (TDR), ambos bajo estándares de aseguramiento de la calidad, son los dos métodos utilizados rutinariamente para el diagnóstico parasitológico del paludismo. La microscopía óptica sigue siendo la prueba de oro para el diagnóstico parasitológico del paludismo.

La observación cuidadosa por un microscopista experto, así como preparaciones hemáticas bien realizadas y coloreadas continúan siendo el método de referencia para la detección e identificación de plasmodios. Este método es sensible, informativo en cuanto a especie y estadios circulantes, cuantificable, puede ser acoplado a distintos programas de control de enfermedades y provee un registro permanente de hallazgos diagnósticos, que pueden ser sujetos a control de calidad. El buen diagnóstico depende directamente de la calidad de la muestra obtenida, su procesamiento y su observación microscópica, así como de la capacidad del microscopista, por lo tanto se debe contar con un personal entrenado, constantemente capacitado y monitoreado, con un sistema que asegure la calidad del diagnóstico siendo necesario estandarizar los procedimientos y sistematizar los mecanismos de supervisión y control de calidad.

El propósito de este Manual Operativo es contribuir a que el personal que trabaja en Salud Pública, cuente con una herramienta que sirva para fortalecer el diagnóstico de paludismo en todo el país, a fin de uniformar y optimizar el trabajo realizado en todos los laboratorios del país, teniendo un instrumento en donde se indican los procedimientos normativos para la obtención de un diagnóstico de calidad de forma oportuna lo que contribuirá con la prevención de la reintroducción y el restablecimiento de la enfermedad en el país.

El presente manual es de aplicación al diagnóstico referencial y asistencial de paludismo en todos los establecimientos de salud de Argentina.

SECCIÓN I

EL PALUDISMO

COPIA NO CONTROLADA

CAPÍTULO 1: ASPECTOS GENERALES DEL PALUDISMO

1.1. TAXONOMÍA DE *PLASMODIUM*

Los parásitos del paludismo son protozoos (del griego protos=primero; zoon=un animal viviente) correspondientes a organismos unicelulares. Los esporozoos (del griego sporos=una semilla; zoon=animal viviente), son protozoos que forman esporos después de la unión de las células sexualmente diferenciadas. La clase Sporozoea, a la cual pertenecen los parásitos de la malaria, está dividida en varios órdenes, clasificados a su vez en sub-órdenes, uno de los cuales es el sub-orden Haemosporidiidae. Los Haemosporidiidae son parásitos que pasan una parte de su ciclo biológico en las células sanguíneas. En el género *Plasmodium*, perteneciente al sub-orden Haemosporidiidae, la multiplicación asexual o esquizogonia toma lugar en los glóbulos rojos del hospedador (algunas especies pueden multiplicarse en células de otros tejidos).

Incluidas en el género *Plasmodium* hay más de 100 especies, que infectan al hombre y otros mamíferos, aves y reptiles. Las cinco especies que infectan al hombre son: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium knowlesi*.

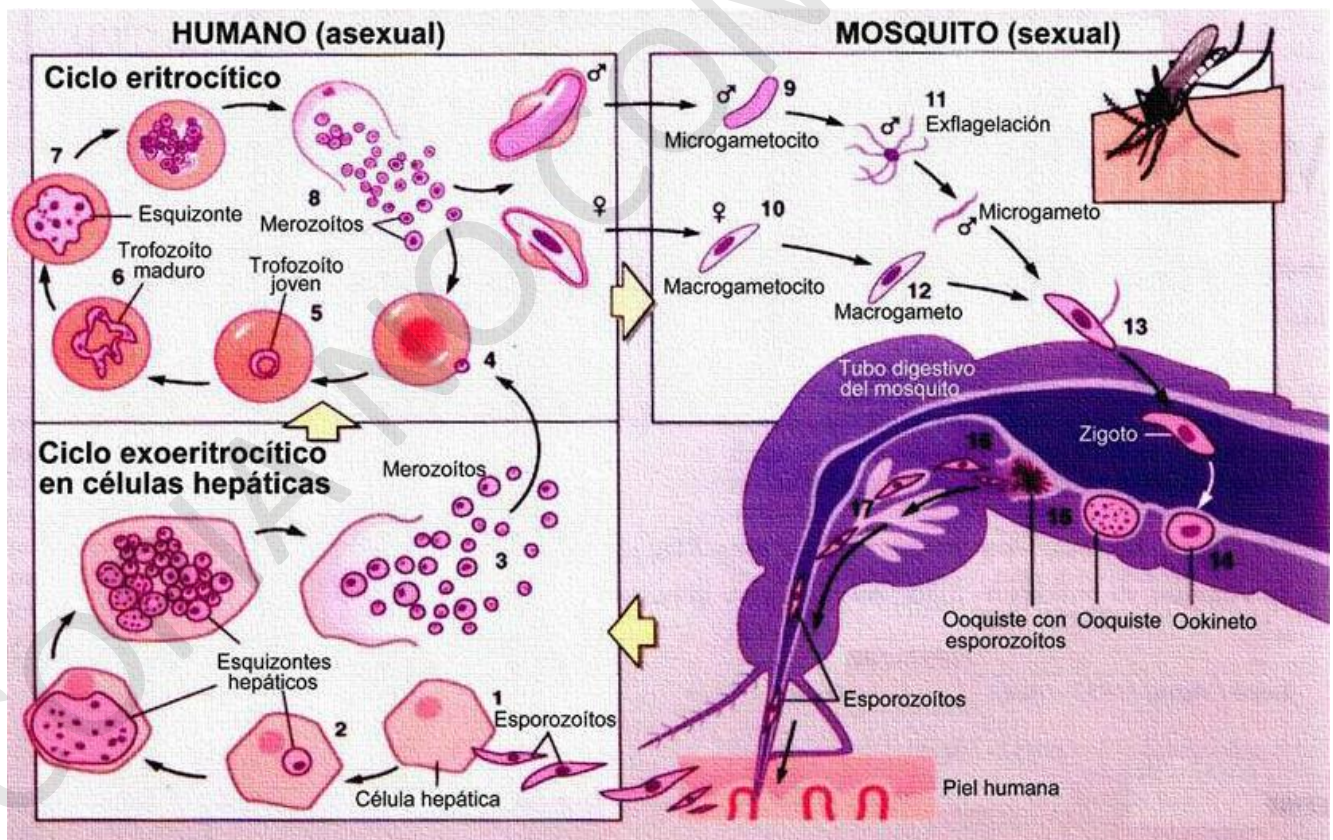
La posición taxonómica de los parásitos del paludismo es:

- Subreino Protozoa
- Phylum Apicomplexa
- Clase Sporozoea
- Subclase Coccidia
- Orden Eucoccidiida
- Suborden Haemosporidiidea
- Familia Plasmodiidae
- Género *Plasmodium*

1.2. CICLO BIOLÓGICO

El ciclo evolutivo de las especies de plasmodios que infectan al hombre es similar. Comporta dos hospederos:

- los mosquitos del género *Anopheles*, en los cuales los parásitos efectúan el ciclo sexuado o esporogonia (del griego sporos=una semilla; genesis=producción)
- el hospedador vertebrado (humano), en donde se efectúa la multiplicación asexual o esquizogonia (del griego schizein=fragmentar; genesis=producción), con dos fases: la primera que ocurre en los hepatocitos (exoeritrocítica) y la segunda en los eritrocitos (eritrocítica).



Ciclo biológico de los parásitos del paludismo humano. Ciclo en el humano (1 a 10) y en el mosquito (9 a 17). Los estadios exoeritrocíticos son 1 a 3 (en *P. vivax* y *P. ovale* un estadio quiescente de hipnozoitos puede persistir en el hígado causando recaídas), los estadios eritrocíticos son 4 a 8, y las formas sexuales (también circulantes en sangre) son 9 y 10.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

1. Invasión del esporozoíto en el hepatocito humano
2. Esquizonte exoeritrocítico
3. Ruptura del hepatocito liberando los merozoítos
4. Invasión del eritrocito humano por merozoíto
5. Trofozoíto (forma de anillo)
6. Trofozoíto maduro
7. Esquizonte
8. Ruptura del eritrocito liberando los merozoítos
9. Microgametocito masculino
10. Macrogametocito femenino
11. Exflagelación del microgametocito
12. Macrogameto y microgameto
13. Fertilización y formación del cigoto
14. Ooquineto e invasión en el epitelio del intestino medio del mosquito
15. Formación de ooquiste y esporozoíto en el epitelio del intestino medio del mosquito
16. Ruptura del ooquiste y liberación de los esporozoítos
17. Migración de esporozoítos a las glándulas salivales del mosquito y luego, a través de la probóscide en la próxima víctima


1.2.1. Desarrollo en el mosquito

Desarrollo sexual

Cuando los gametocitos se ingieren durante la alimentación del mosquito hembra con sangre humana, ellos maduran a gametos en el intestino del vector. El microgameto masculino sufre una división nuclear por un proceso denominado exflagelación, en el cual el microgameto deja el eritrocito, se transforma en móvil y penetra el macrogameto femenino. Se desarrolla así el estadio fertilizado llamado cigoto, el cual se elonga, se hace móvil y se diferencia a ooquineto.

Desarrollo esporogónico

El ooquineto secreta una fina pared y se desarrolla a ooquiste, el cual se dirige hacia el hemocele del mosquito. En pocos días a 2 semanas, el ooquiste madura con la formación de esporozoítos. Cuando el ooquiste se rompe, los esporozoítos son liberados en el hemocele, se dispersan en el cuerpo y algunos se dirigen a las glándulas salivales. Cuando el mosquito se alimenta nuevamente, los esporozoítos son inyectados con la saliva en el hospedador.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
Diagnóstico laboratorial de paludismo		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 7 de 210

1.2.2. Desarrollo en el hospedador vertebrado (humano)

Desarrollo exoeritrocítico

Cuando el vector se alimenta, los esporozoítos contenidos en las glándulas salivales del mosquito son descargados en el sitio de la picadura. Luego estos estadíos infectivos son llevados por vía sanguínea hasta el hígado, donde penetran las células del parénquima y comienzan a crecer, iniciando el ciclo preeritrocítico o exoeritrocítico.

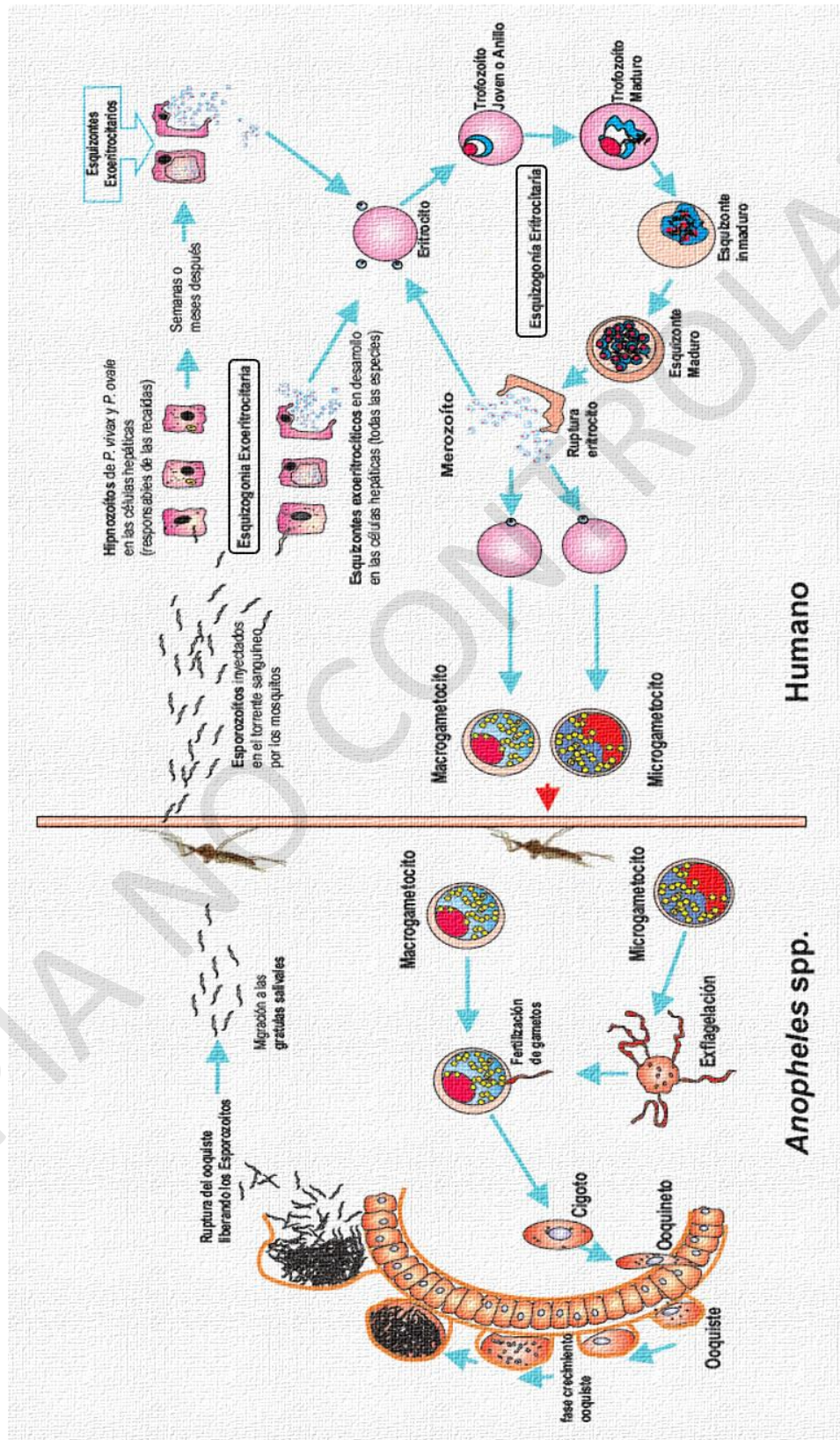
Los esporozoítos toman forma redondeada u ovalada y comienzan a dividirse repetidamente. En unos pocos días desarrollan a un esquizonte más grande que la célula original, la cual estalla y libera miles de merozoítos exoeritrocíticos. Una vez que estos merozoítos dejan el hígado, invaden los glóbulos rojos iniciando el ciclo eritrocítico.

Se ha reportado para *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale*, que una esquizogonia secundaria puede ocurrir a partir de organismos quiescentes en el hígado hasta un tiempo posterior. Estos estadíos latentes han sido denominados hipnozoítos.

Desarrollo eritrocítico

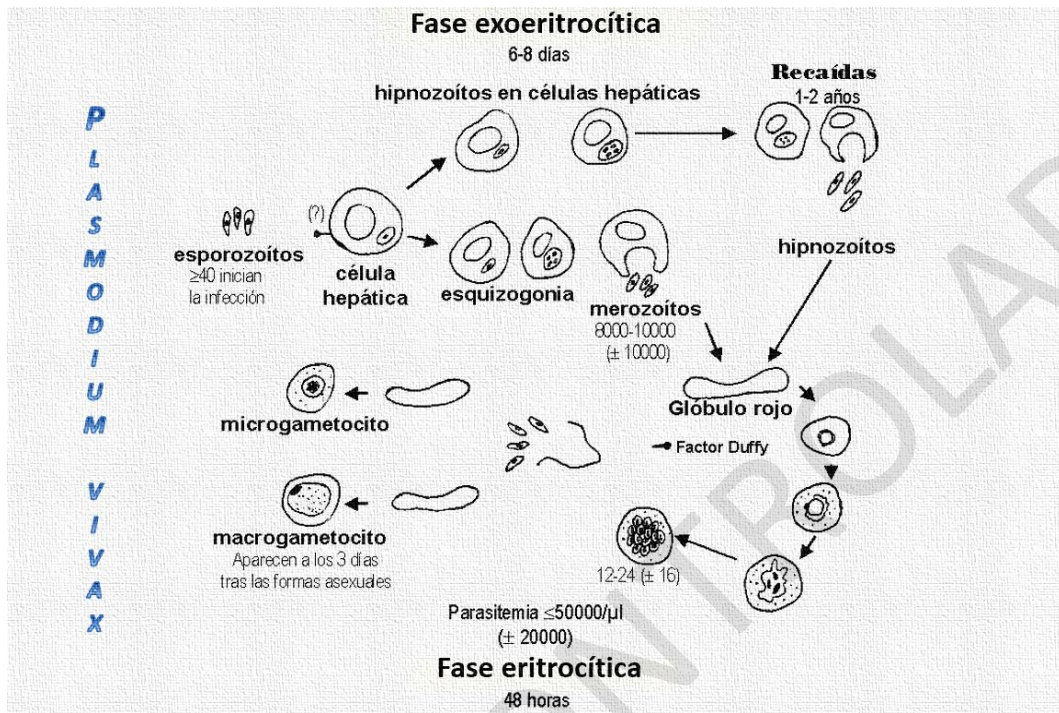
Esta fase se inicia cuando miles de merozoítos invasivos son liberados de esquizontes maduros que infectan los hepatocitos. Estos merozoítos invaden los eritrocitos y desarrollan a trofozoítos. Estos trofozoítos jóvenes son vacuolados, con forma de anillo, más o menos ameboides. Una porfirina férrica y la hematina, generada por el metabolismo de la hemoglobina, se combinan para formar el pigmento malárico. El núcleo comienza a dividirse, dando origen al esquizonte joven. El esquizonte maduro contiene nuevos merozoítos que, por ruptura del esquizonte son liberados a la circulación y pueden invadir nuevos eritrocitos, a partir de lo cual se inicia una nueva esquizogonia eritrocítica. Después de varias generaciones eritrocíticas, algunos merozoítos que entran en el glóbulo rojo se diferencian a los estadíos sexuales de gametocito femenino y masculino.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

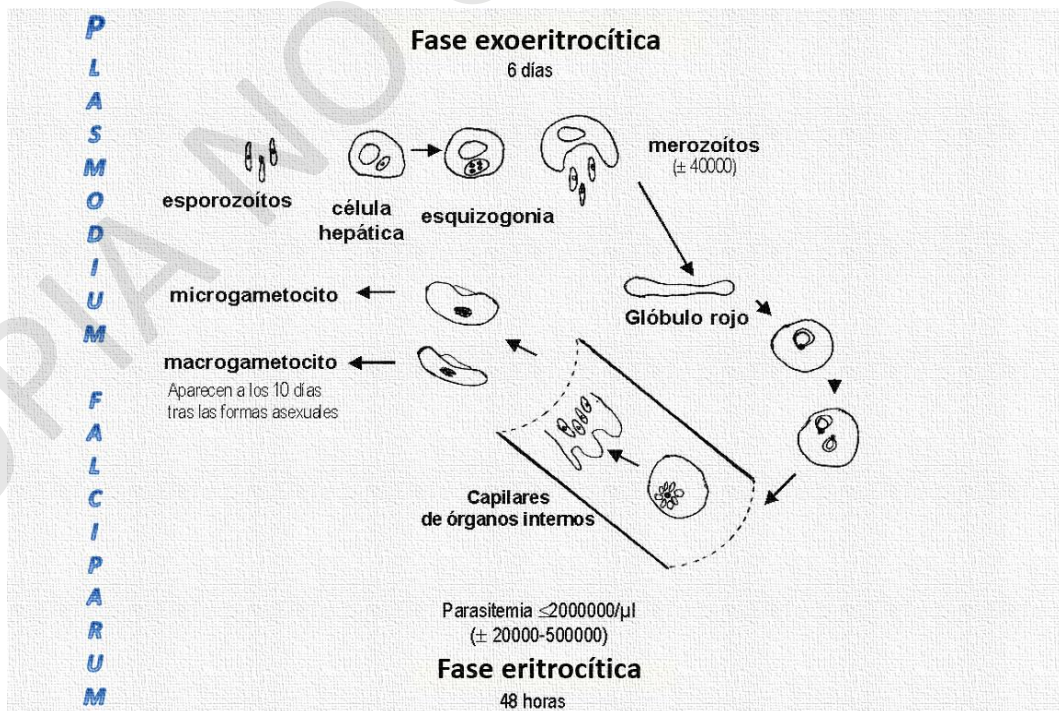


Ciclo biológico completo de los parásitos del paludismo humano.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

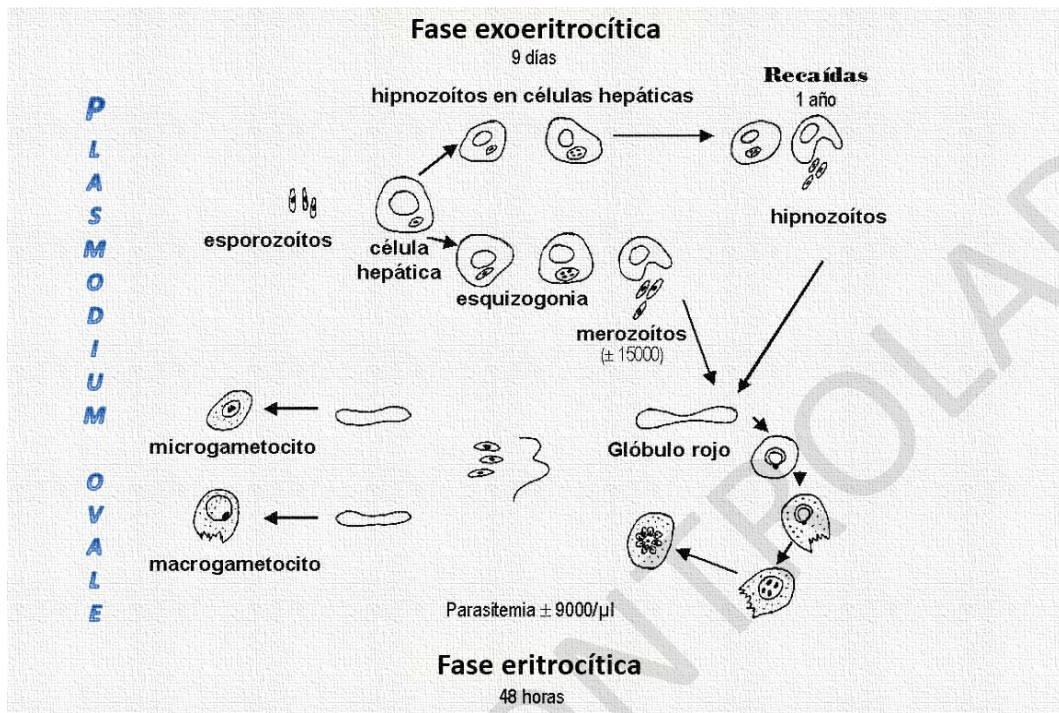


Ciclo biológico de *Plasmodium vivax* en el hombre (con el permiso de Jorge N. Velásquez, autor).

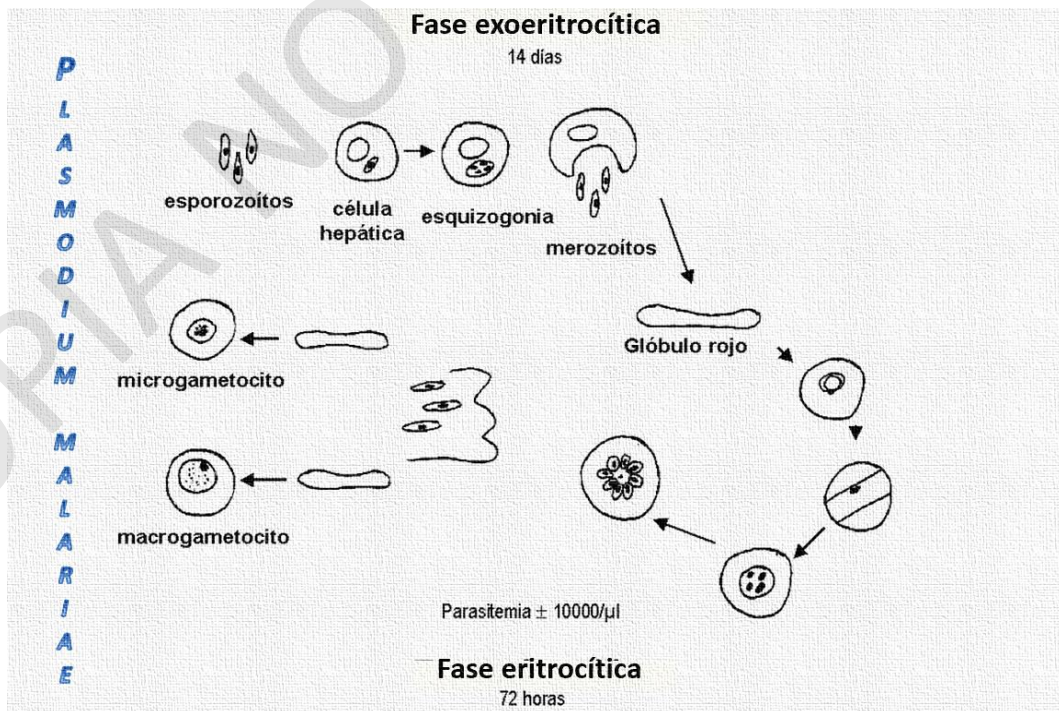


Ciclo biológico de *Plasmodium falciparum* en el hombre (con el permiso de Jorge N. Velásquez, autor).

Diagnóstico laboratorial de paludismo

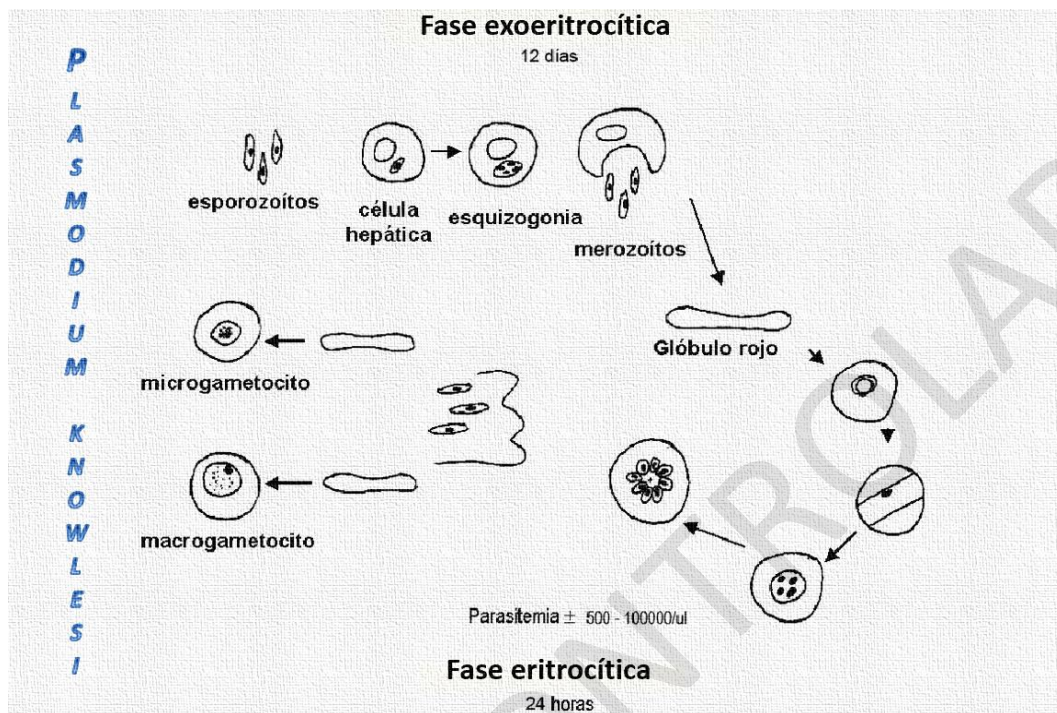


Ciclo biológico de *Plasmodium ovale* en el hombre (con el permiso de Jorge N. Velásquez, autor).



Ciclo biológico de *Plasmodium malariae* en el hombre (con el permiso de Jorge N. Velásquez, autor).

Diagnóstico laboratorial de paludismo



Ciclo biológico de *Plasmodium knowlesi* en el hombre (con el permiso de Jorge N. Velásquez, autor).

1.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

El diagnóstico confiable y temprano del paludismo es indispensable para el correcto manejo clínico del paciente y la administración de un tratamiento eficaz y oportuno. La técnica de rutina disponible para el diagnóstico de esta patología es el examen microscópico de la gota gruesa y el extendido hemático bajo estándares de aseguramiento de la calidad del diagnóstico.

LA MICROSCOPIA ÓPTICA DE GOTA GRUESA Y EXTENDIDO HEMÁTICO SERÁ LA TÉCNICA UTILIZADA PARA EL DIAGNÓSTICO ASISTENCIAL Y REFERENCIAL DE PALUDISMO EN ARGENTINA

Existen otras técnicas de diagnóstico como las pruebas de diagnóstico rápido, capaces de otorgar un resultado al poco tiempo de haberse realizado la toma de muestra, las técnicas inmunológicas y de biología molecular, pero estas no son utilizadas de forma rutinaria ni se encuentran disponibles en todos los laboratorios.

1.3.1. Gota gruesa y extendido hemático

El estudio clásico consiste en colección de sangre por punción digital, preparación de gota gruesa y extendido hemático, coloración de los preparados sanguíneos con Giemsa, examen microscópico a 1000x (la observación se realiza a través de un microscopio binocular con un objetivo de 100x y ocular de 10x). Esta técnica puede ser realizada también a partir de sangre obtenida por venopuntura.

Permite conocer la especie de *Plasmodium* infectante, los estadíos y la densidad parasitaria, con una alta sensibilidad (4 a 20 parásitos por microlitro en gota gruesa) y especificidad (en extendido hemático). El diagnóstico se realiza en general en la gota gruesa y se utiliza el extendido hemático en caso que sea difícil la diferenciación de la especie.

1.3.2. Tests de diagnóstico rápido (TDR)

Estos tests se basan en la detección de antígenos derivados de los parásitos palúdicos en sangre lisada, utilizando métodos inmunocromatográficos. La mayoría emplea tiras que contienen anticuerpos monoclonales anti-antígenos parasitarios blanco. Los antígenos blanco en los tests de diagnóstico rápido disponibles actualmente son proteína rica en histidina II (HRP-II), producida por trofozoítos y los gametocitos jóvenes de *Plasmodium falciparum*; lactato dehidrogenasa parasitaria (pLDH), producida por los estadíos sexuales y asexuales del parásito y aldolasa.

Los principales usos de los TDR son:

- Diagnóstico por parte de los agentes de salud distantes de buenos servicios de microscopía.
- Diagnóstico remoto en personal laboral organizado en zonas donde el paludismo es endémico. Investigación de brotes y encuestas de prevalencia de paludismo.
- Diagnóstico realizado por los propios individuos o grupos adiestrados.
- Diagnóstico "fuera de horario" en laboratorios hospitalarios o consultorios.

1.3.3. Técnicas inmunológicas

Existen métodos inmunológicos para el diagnóstico de paludismo, como inmunofluorescencia, radioinmunoensayo, hemaglutinación y ELISA, pero éstas no reemplazan a la microscopía y no se utilizan de forma rutinaria, sino principalmente para estudios epidemiológicos de investigación.

ELISA (enzimoinmunoensayo) y RIA (radioinmunoensayo): Pueden detectar cantidades muy bajas de células parasitadas. Se emplean para estudios de campo tanto epidemiológicos como de ensayo de vacunas.

IFA (inmunofluorescencia indirecta): Es el ensayo que se utilizó originalmente para detectar anticuerpos contra plasmodios y se considera como de referencia en el serodiagnóstico y la seroepidemiología de la malaria. Se ha establecido una guía para el uso de este método como herramienta de diagnóstico: 1) un paciente febril con sospecha de malaria y repetidas exámenes microscópicos negativos, 2) muestras de un dador de transfusión sanguínea que precedió a malaria en el receptor 3) si los ensayos van a ser utilizados para investigación o estandarización de sueros controles para protocolos de IFA.

1.3.4. Técnicas de amplificación del ácido nucleico

Las técnicas de amplificación del ácido nucleico, que son varios órdenes de magnitud más sensibles que la microscopía y lo TDR, se utilizan cada vez más en estudios epidemiológicos, investigaciones del origen de infecciones y estudios específicos como el análisis de parasitemia en ensayos controlados de infección de malaria en humanos, ensayos de eficacia de medicamentos e investigación de resistencia a fármacos. También se están utilizando para evaluar nuevas estrategias e intervenciones para reducir la transmisión, tales como la administración masiva de medicamentos, la detección y tratamiento masivos, y la detección y tratamiento focales.

SECCIÓN II

LA MICROSCOPIA ÓPTICA

COPIA NO CONTROLADA

CAPÍTULO 2: PREPARACIÓN DE MUESTRAS HEMÁTICAS

2.1. NORMAS BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD

Las buenas prácticas de bioseguridad deben ser implementadas durante todos los procedimientos realizados, y son fundamentales en la prevención de exposición a microorganismos infectocontagiosos. Todas las muestras deberán ser tratadas como altamente infecciosas. El principal riesgo al manipular las muestras es la contaminación de las manos y de las mucosas de los ojos, la nariz y la boca. La contaminación puede ser producida por lesiones penetrantes causadas por objetos cortantes o punzantes y por derrames o salpicaduras de la muestra.

Las recomendaciones básicas son:

1. Todo el personal debe estar capacitado en relación con las tareas que desempeña y guiarse por procedimientos operativos estándar consignados por escrito.
2. Se debe utilizarse ropa de protección (guardapolvos o ambos).
3. Se debe utilizar guantes descartables al manipular muestras.
4. No se debe tocar los ojos, la nariz u otras mucosas expuestas, ni la piel con las manos enguantadas.
5. Se debe lavar las manos con agua y jabón inmediatamente después de cualquier contaminación y una vez finalizado el trabajo, haya o no utilizado guantes.
6. Debe comunicarse de inmediato al superior todo derrame, accidente y contacto manifiesto o probable con muestras infecciosas.
7. No se debe comer, beber ni fumar en los laboratorios.
8. 10. Cada laboratorio debe contar con un botiquín con insumos básicos para primeros auxilios.
9. 11. Las lancetas o jeringas usadas se deben colocar en un recipiente para elementos cortopuzantes

10. 12. Se deben desinfectar las superficies de trabajo al concluir las operaciones y al final del día. Se
11. recomienda una solución de lavandina al 10%, la cual debe estar protegida de la luz y el calor.

Se tendrán en cuenta las condiciones de bioseguridad descritas en los Manual de Bioseguridad del CDC y OMS (Bioseguridad en laboratorios de microbiología y biomedicina CDC; y Bioseguridad en los laboratorios Organización Mundial de la Salud-3º ed).

2.2. LIMPIEZA Y ALMACENAJE DE PORTAOBJETOS

2.2.1. Propósito

Detallar el procedimiento para seleccionar, limpiar y almacenar correctamente portaobjetos destinados a la preparación de gota gruesa y extendido hemático para el diagnóstico microscópico del paludismo.

2.2.2. Introducción

Los portaobjetos de vidrio utilizados en microscopía generalmente se suministran en cajas de 50 o 72 y se identifican como "lavado" o "prelavado", lo cual no significa que puedan usarse directamente desde la caja. Los portaobjetos aunque estén nuevos siempre presentan grasa adherida al cristal, la cual es removida con ligeros movimientos con una esponja impregnada de jabón pH neutro y enjuagues.


Es importante asegurarse de que los portaobjetos que se utilizarán estén limpios y libres de arañazos. Portaobjetos sucios y rayados pueden dar como resultado preparados sanguíneos mal realizados, que pueden comprometer la calidad y la integridad del diagnóstico.

2.2.3. Materiales

- Etanol:acetona 70:30
- Jabón de Bernard
- Portaobjetos
- Recipiente resistente al calor
- Recipiente de vidrio con tapa
- Probeta
- Esponja suave
- Paños que no dejen pelusas (de los utilizados para secar la vajilla o la cristalería)
- Canilla con fuente de agua limpia.
- Etiquetas
- Marcador indeleble

2.2.4. Procedimiento

1. Colocar todos los portaobjetos (usados o nuevos, por separado) en un recipiente resistente al calor
2. Preparar 200 ml de solución jabonosa de Bernard al 1% en agua caliente a 50-60°C y agregarla a los portaobjetos.
3. Hervir aproximadamente 10 minutos y dejar enfriar.
4. Frotar ambos lados del portaobjetos con la esponja, sujetándolo entre el dedo pulgar y el índice.
5. Enjuagar para retirar el jabón y dejar en agua corriente.
6. Enjuagar los portaobjetos uno por uno en agua limpia para eliminar el detergente.
7. Eliminar el exceso de agua de los portaobjetos.
8. Colocar los portaobjetos en el recipiente con etanol:acetona y tapar. Mantenerlo alejado de la luz solar directa.
9. Para utilizar, secar con un paño limpio que no deje pelusas. Sostener el portaobjetos siempre por los bordes.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
Diagnóstico laboratorial de paludismo		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 18 de 210

10. Colocar los portaobjetos limpios en la caja para portaobjetos rotulada. Están listos para ser utilizados.

2.2.5. Interferencias

Los portaobjetos que tengan ligeros rayones no se consideran aptos para las preparaciones sanguíneas ya que esto disminuye la calidad de la lámina.

Si no se evita guardarlos en un medio seco, existe la posibilidad de que haya crecimiento de hongos.

2.3. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE POR PUNCIÓN DIGITAL

2.3.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para la toma de muestras de sangre por punción digital para el diagnóstico microscópico de paludismo.

2.3.2. Introducción

Las muestras a obtener son las siguientes:

- **Extendido hemático:** consiste en una capa simple de glóbulos rojos. Revela detalles del glóbulo rojo parasitado y permite la identificación de especie.
- **Gota gruesa:** se efectúa con un gran número de glóbulos rojos deshemoglobinizados. Todos los parásitos presentes son concentrados en un área más pequeña que en el extendido hemático, son observados más rápidamente por microscopía y permite el diagnóstico con bajos niveles de parasitemia.

Diagnóstico laboratorial de paludismo



Gota gruesa Extendido hemático

2.3.3. Materiales

- Portaobjetos limpios (preferiblemente con borde esmerilado para recoger los datos de identificación del paciente)
- Lancetas estériles
- Alcohol
- Algodón
- Caja para secado y almacenamiento de muestras
- Planilla de registro
- Lápiz de cera
- Lápiz
- Bolígrafo
- Guantes
- Descartador de elementos cortopunzantes

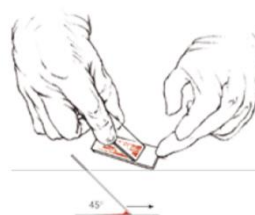
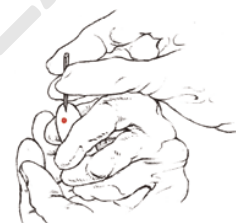
Nota: Los portaobjetos deberán ser nuevos o usados, previamente lavados con agua jabonosa, enjuagados con agua corriente, secados y almacenados libres de polvo. No deberán utilizarse vidrios rayados o con roturas. Los portaobjetos limpios deberán ser manipulados por los bordes para evitar marcas o grasitud sobre la superficie. Ver instrucciones del ítem 2.2.

2.3.4. Procedimiento

Durante la toma de muestras el operador deberá utilizar guantes. El extendido hemático y la gota gruesa podrán ser tomados en un solo portaobjetos, dividido con un trazo de lápiz de cera. Para la obtención de la muestra se realizará el siguiente protocolo:

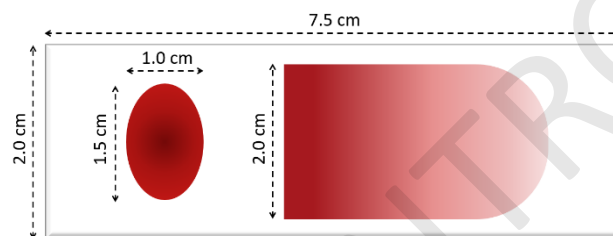
Diagnóstico laboratorial de paludismo

1. Sostener la mano izquierda del paciente con la palma hacia arriba y seleccionar el dedo anular.
2. Limpiar firmemente el dedo con algodón embebido en alcohol, para remover suciedad o grasitud de la yema del dedo. Secar con un algodón limpio fuertemente para estimular la circulación sanguínea.
3. Punzar la cara lateral del dedo con una lanceta estéril. Aplicar una presión suave para que salga la primer gota, descartarla en un algodón y asegurarse que no quede resto de algodón en el dedo.
4. Colectar la sangre rápidamente manipulando un portaobjetos limpio por los bordes.
5. Aplicar presión suave sobre el dedo y colectar una pequeña gota en el medio del vidrio (para el extendido).
6. Aplicar más presión y colectar 2 o 3 gotas mayores sobre el vidrio a 1 cm de la colectada para el extendido.
7. Limpiar la sangre remanente en el dedo con un algodón.
8. Para el extendido hemático: usando un segundo portaobjetos como "extensor" y con el vidrio con la gotas de sangre apoyado en una superficie plana y firme, tocar la gota pequeña con el extensor permitiendo que la sangre corra por su borde. Firmemente deslizar el extensor a lo largo del portaobjetos, manteniendo el extensor en ángulo de 45°. Asegurarse de que el extensor esté continuamente en contacto con el portaobjetos durante todo el tiempo en que la sangre está siendo extendida.
9. Para la gota gruesa: usando la esquina del extensor, rápidamente juntar las gotas de sangre y extenderlas para realizar la gota gruesa. La sangre no debe ser mezclada excesivamente pero debe ser extendida con 3 a 6 movimientos circulares o rectangulares. La gota gruesa debe ser de aproximadamente 1 cm de diámetro.
10. Rotular el portaobjetos con el nombre o número de paciente y la fecha.



Diagnóstico laboratorial de paludismo

11. Permitir el secado sobre una superficie plana, protegido de insectos polvo y calor extremo.
12. Realizar por lo menos 3 portaobjetos por paciente.
13. Dividir el extendido hemático y la gota gruesa tomados en un solo portaobjetos con un trazo de lápiz de cera.
14. Utilizar el patrón para la preparación de la lámina:



Patrón a utilizar para la preparación de las láminas


2.3.5. Comentarios

Existen fallas comunes cuando se efectúan preparados hemáticos:

- demasiada sangre: en gota gruesa habrá muchos glóbulos blancos por campo y pueden esconder los parásitos; en extendido hemático se superponen los glóbulos rojos y no se podrá observar.
- poca sangre: la muestra será escasa para examinar.
- portaobjeto engrasado: el extendido puede estar distribuido no uniformemente y la gota gruesa puede desprenderse.
- Extensor roto en el borde: extendido hemático no uniforme y a rayas.



Defectos en preparaciones hemáticas

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
Diagnóstico laboratorial de paludismo		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 22 de 210

Especificaciones de desempeño del procedimiento:

Límite de detección: el umbral teórico de detección en gota gruesa es de cuatro parásitos/ μl de sangre (100 campos/objetivo de inmersión es equivalente aproximadamente a 0.25 μl de sangre).

Sensibilidad: la gota gruesa tiene una alta sensibilidad por la que es considerada estándar de oro para el diagnóstico de la malaria.

Especificidad: el extendido hemático es específico debido a que es tres veces menos concentrado que la gota gruesa.

COPIA NO CONTROLADA

CAPÍTULO 3: TINCIÓN DE MUESTRAS HEMÁTICAS

3.1. NORMAS BÁSICAS DE BIOSEGURIDAD

Se debe realizar la coloración de las láminas en un área ventilada.

Deben practicarse precauciones universales, incluido el uso de equipo de protección personal relevante, como guantes, anteojos de seguridad y un guardapolvo.

El metanol (alcohol metílico) es inflamable y altamente tóxico si se inhala o se ingiere; puede causar ceguera e incluso la muerte si se ingiere en cualquier cantidad. Se debe evitar el contacto y la inhalación.

3.2. TINCIÓN DE GIEMSA

3.2.1. Propósito

Describir el procedimiento apropiado para la coloración con Giemsa de preparados hemáticos para diagnóstico de paludismo.

3.2.2. Introducción

Para la identificación de los parásitos es necesario colorear las muestras. La coloración de Giemsa es la más común. En ella, el fijador y el colorante están separados.

Una lámina de sangre adecuadamente teñida es fundamental para el diagnóstico del paludismo, especialmente para la identificación de especie. El uso de la tinción de Giemsa es el procedimiento recomendado y más confiable para teñir gota gruesa y extendido hemático.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Es una coloración tipo Romanowsky con base de alcohol, formado por una combinación de colorantes básico, azul de metileno y sus derivados oxidados, y el colorante ácido eosina. El colorante se encuentra disponible de forma comercial (o puede ser preparado a partir de sus componentes individuales en el nivel jurisdiccional y distribuido a través de la red de laboratorios.)

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

La gota gruesa y el extendido hemático se tiñen simultáneamente, con la diferencia que el extendido requiere una fijación previa con metanol y la gota gruesa no, lo cual permite la deshemoglobinización de los glóbulos rojos durante la tinción con Giemsa. La deshemoglobinización de la gota gruesa consiste en la ruptura del glóbulo rojo y la disolución de su contenido, permitiendo una mejor visualización de las muestras, eliminando la capa de glóbulos rojos, y dejando a los parásitos de forma libre, en un fondo claro.

El pH ideal para permitir la identificación adecuada de las especies es 7.2.

3.2.3. Materiales

- Jarra de Coplin
- Solución de Giemsa 20%
- Metanol
- Agua corriente
- Probeta
- Pipeta
- Reloj
- Gradilla de secado
- Guantes

3.2.4. Preparación de soluciones

Solución de Giemsa 20%

Solución stock de Giemsa 20 ml

Agua corriente 80 ml

Filtrar con papel Whatman #1 y usar inmediatamente.

3.2.5. Procedimiento

1. Fijar los extendidos hemáticos colocándolos en una jarra para portaobjetos conteniendo metanol (sólo hasta la altura del extendido). Evitar que el metanol o sus vapores entren en contacto con la gota gruesa (ésta no se fija). Fijar durante 1 minuto.

Nota: Si se prolonga demasiado el tiempo de fijación puede resultar difícil observar las granulaciones de Schüffner y Maurer. La gota gruesa no debe fijarse para permitir la deshemoglobinización.

2. Colocar la solución de Giemsa 20% en la jarra de coloración hasta que los portaobjetos se encuentren totalmente cubiertos.
3. Dejar en coloración durante 20 minutos (este tiempo deberá ser controlado con cada lote de solución stock de Giemsa).
4. Lavar con agua corriente.
5. Secar al aire en una gradilla de secado de portaobjetos.

3.2.6. Comentarios

- Los preparados sanguíneos deben estar completamente secos antes de teñirse.
- Los preparados sanguíneos deben ser coloreados lo más pronto posible, ya que períodos prolongados de almacenamiento pueden causar autofijación y retención del colorante.
- Después del secado, los preparados son observados por inmersión, colocando el aceite directamente sobre la muestra sin cubrir.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- La solución stock de Giemsa debe ser testada cada vez que se inicia un nuevo lote. Deberán considerarse la concentración y tiempo de coloración adecuados para la demostración de plasmodios. Deberán observarse los distintos componentes celulares teñidos.
- Los materiales de vidrio y plástico deben estar limpios y secos antes de su uso.
- El material utilizado para la tinción de Giemsa debe enjuagarse inmediatamente después del uso en agua limpia para eliminar tanto colorante como sea posible. Luego debe remojar durante un tiempo en una solución de detergente antes del lavado.
- La tinción es muy variable en función del pH.
- El agua corriente para la preparación del colorante podrá ser reemplazada por agua destilada o desionizada tamponada con pH de 7.2. Para ajustar el pH podrán emplearse las soluciones de Na_2HPO_4 2% si el pH es inferior a 7.2 (demasiado ácido) o KH_2PO_4 2% si el pH es superior a 7.2 (demasiado alcalino) o podrán emplearse pastillas amortiguadoras.

CAPÍTULO 4: OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

4.1. NORMAS BÁSICAS DE SEGURIDAD

La fuente de poder y las conexiones del microscopio deben ser seguras y estabilizadas y no deben exponer al personal a un riesgo de electrocución. El microscopio y las conexiones eléctricas no deben exponerse al agua.

Se debe tener cuidado para evitar daños a los ojos por la exposición a la alta intensidad de luz.

El microscopio se debe usar ergonómicamente para evitar la tensión de la espalda y el cuello.

4.2. USO Y MANTENIMIENTO DEL MICROSCOPIO

4.2.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para el uso y mantenimiento del microscopio óptico de campo claro.

4.2.2. Introducción

Los microscopios ópticos binoculares compuestos se recomiendan para la microscopía de paludismo, con objetivos 10x y 40x, un objetivo 100x para inmersión y oculares de 10x. La profundidad máxima de campo se puede lograr solo si la fuente de luz del microscopio tiene suficiente luminosidad para permitir el cierre del diafragma óptimamente sin pérdida de brillo. Debe tener una lámpara incorporada, un condensador ajustable y puede tener un filtro azul de

luz diurna. La precisión de la microscopía de paludismo depende del correcto funcionamiento y uso del microscopio. Los microscopios deben configurarse para un rendimiento óptimo, protegidos de daños, utilizados ergonómicamente, mantenidos regularmente y, si es necesario, reparados por personal calificado. El cuidado de los microscopios es particularmente importante en las instalaciones en áreas polvorientas, donde los microscopios deben cubrirse cuando no se usan y antes de limpiar el piso para evitar dañar el microscopio.

4.2.3. Materiales

- Microscopio compuesto equipado con oculares de 10x, objetivos de 10x, 40x y 100x de inmersión y platina mecánica
- Funda

Para el uso

- Líquido limpiador de lentes apropiado (xileno, para el objetivo de inmersión, para otras piezas como oculares y prismas usar alcohol absoluto)
- Papel para limpieza de lentes apropiado
- Aceite de inmersión apropiado
- Solución comercial de limpieza de microscopio
- Paño suave

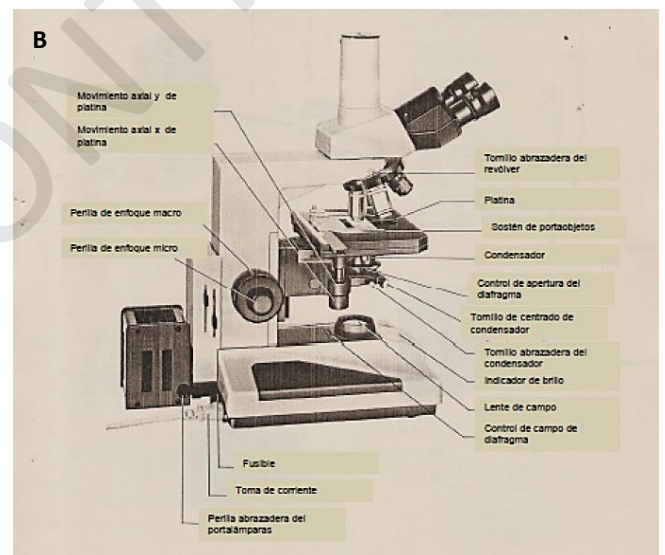
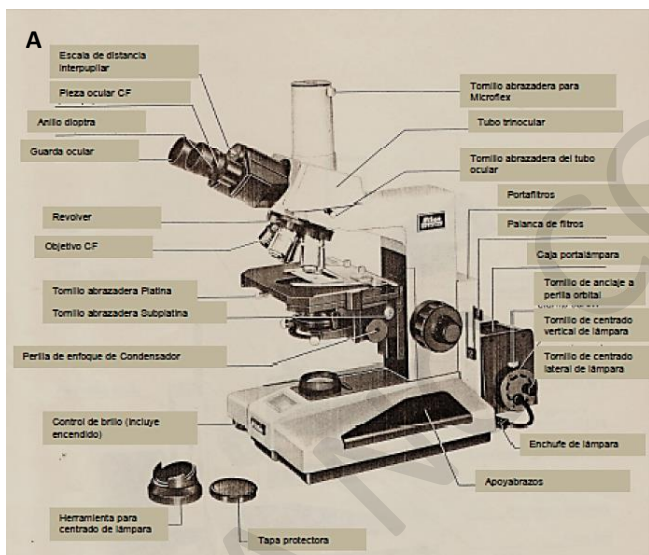
Para el mantenimiento

- Lámparas de repuesto según marca y modelo del equipo.

Partes del microscopio

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

- Sistema de soporte (pie, brazo, portaobjetivos giratorio, platina mecánica)
- Sistema de magnificación (objetivo, ocular)
- Sistema de iluminación (condensador con diafragma, fuente de luz, filtros)
- Sistema de ajuste (tornillo macrométrico, tornillo micrométrico, tornillos de ajuste del condensador).



Descripción (ejemplo) de microscopio óptico. A) Vista lateral derecha. B) Vista lateral izquierda.

4.2.4. Procedimiento

Uso de rutina

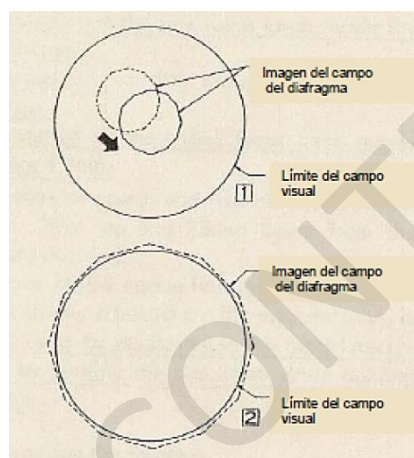
Centrado del condensador:

1. Cerrar el campo del diafragma en la base del microscopio, reduciendo el tamaño por medio de la perilla giratoria que controla su apertura. Rotar el foco del condensador moviéndolo

Diagnóstico laboratorial de paludismo

verticalmente desde su perilla hasta que la imagen del campo del diafragma se aclare y se vea en forma definida sobre la superficie de la muestra.

2. Llevar la imagen del diafragma al centro del campo, por medio de los tornillos que centran el condensador.
3. Cambiar al objetivo de 40X y ajustar el campo del diafragma al campo del ocular de forma tal que estos se superpongan.



Centrado del condensador

Operación del microscopio:

1. Encender el microscopio.
2. Revisar que esté colocado el objetivo de menor aumento.
3. Colocar el portaobjeto sobre la platina de forma que la luz traspase el espécimen a observar.
4. Ajustar los binoculares a la preferencia del operador.
5. Ajustar la intensidad lumínica a la preferencia del operador.
6. Enfocar el material moviendo con una mano primero el tornillo micrométrico y luego el micrométrico, y con la otra mano moviendo el portaobjeto.
7. Rotar el revólver a objetivos de mayor aumento. Para el aumento de 1000x, es necesario colocar una gota de aceite de inmersión sobre el preparado.
8. Si se utilizó aceite de inmersión, limpiar el objetivo con el papel para limpieza de lentes.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

9. Una vez finalizada la observación, retirar el portaobjetos, rotar el revolver al objetivo de menor aumento y apagar la luz.

Alineamiento inicial:

1. Revisar que esté colocado el objetivo de menor aumento.
2. Colocar el portaobjeto sobre la platina de forma que la luz traspase el espécimen a observar.
3. Ajustar los binoculares a la preferencia del operador.
4. Abrir el diafragma lo máximo posible.
5. Subir el condensador lo máximo posible.
6. Encender el microscopio y ajustar la intensidad lumínica a la preferencia del operador.
7. Observar por el ocular y focalizar el espécimen utilizando el macrómetro y micrómetro.
8. Cerrar el diafragma gradualmente hasta ver un polígono luminoso (imagen del diafragma) en el campo del espécimen.
9. Bajar el condensador suavemente hasta que el borde del diafragma sea lo más fino posible.
10. Ajustar con el micrómetro el foco del espécimen.
11. Si la imagen del diafragma no está centrada, centrarla girando suavemente los tornillos del condensador.
12. Abrir el diafragma hasta que la imagen del diafragma salga exactamente del campo de visión. No abrir más que eso.
13. Ajustar el contraste óptimo graduando la apertura del diafragma.

Calibración para medición de especímenes:

1. Poner el micrómetro objetivo sobre la platina del microscopio.
2. Para verificar que toda la escala graduada aparece, enfocar con pequeño aumento observando el número de divisiones de la escala que corresponde exactamente a los valores conocidos grabados en el propio micrómetro objetivo.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

3. Sustituir el ocular común del microscopio por el micrómetro ocular.
4. Con un aumento de 400x hacer que las escalas queden paralelas y con ayuda de la platina mover el micrómetro objetivo hasta que coincidan las 2 primeras líneas de la escala del micrómetro objetivo y del ocular; esto es coincidir el 0 del micrómetro objetivo con el primer trazo del micrómetro ocular.
5. Contar y anotar el número de divisiones del micrómetro ocular entre el espacio comprendido entre los trazos coincidentes del micrómetro objetivo con el aumento indicado.
6. Repetir las instrucciones de los ítems 4 y 5 sustituyendo los aumentos microscópicos desde los mayores a los menores pasando por inmersión obtenidos por la combinación del micrómetro ocular con cada uno de los aumentos del revólver. En cada aumento contar y anotar el número de trazos y sus respectivos aumentos para obtener valores fijos para cada aumento del microscopio.
7. Cada división, o sea el intervalo comprendido entre dos trazos vale 0,01mm o sea 10 μ . Dividir el número de trazos del micrómetro objetivo por el número de trazos del micrómetro ocular y se multiplica el valor obtenido por 10 μ . De este modo se tiene un valor fijo que es anotado para cada uno de los aumentos.

<p>Trazo del micrómetro</p> <p>Trazo del micrómetro ocular</p> <p>Después de la coincidencia del cero de las escalas de los 2 micrómetros anotar el número de trazos del micrómetro ocular contenidos entre dos trazos del micrómetro objetivo.</p> <p>Se puede observar que 8 trazos del micrómetro ocular están contenidos en el intervalo comprendido entre 2 trazos del micrómetro objetivo.</p> <p>1000x</p> <p>Cálculo: $1 \text{ (intervalo del objetivo)} / 8 \text{ (trazos del ocular)}$ $0,125 \times 10\mu = 1,25\mu$</p>	<p>El quinto trazo del micrómetro objetivo coincide con el cuarto trazo del ocular</p>
<p>3 trazos del micrómetro ocular están contenidos en un intervalo entre dos trazos del micrómetro objetivo</p> <p>400x</p> <p>Cálculo: $1 / 3 = 0,3333 \times 10\mu = 3,33\mu$ (Valor fijo para 400x)</p>	<p>El décimo trazo del micrómetro objetivo coincide con el Tercero trazo del ocular</p> <p>40x</p>

Mantenimiento

Limpieza exterior del equipo

1. Limpiar el polvo externo. Limpiar objetivos, oculares, condensador, y diafragma con líquido limpiador de lentes.
2. Aplicar dicho líquido con papel para limpieza de lentes. No poner el líquido directamente sobre las partes.
3. El operador será responsable de esta actividad cada vez que se finaliza el uso.

Limpieza y lubricación interior del equipo

1. Desarmar, limpiar y lubricar el microscopio.
2. El servicio técnico especializado será responsable de esta actividad con una frecuencia anual.

Cambio de lámpara

1. Cambiar la lámpara especificada por el fabricante, sin tocarla con los dedos, tomándola con papel para limpieza de lentes. Revisar el stock de lámparas de repuesto. Se recomienda tener una a dos lámparas de repuesto por cada microscopio.
2. El operador será responsable de esta actividad cada vez que se quemó la lámpara anterior, o cuando ésta provea una intensidad lumínica insuficiente.

4.2.5. Comentarios

- No tocar las lámparas directamente con los dedos. Siempre utilizar papel para lentes para reemplazarlas, ya que los aceites de la piel pueden quemarla y disminuir la intensidad lumínica de la lámpara, disminuyendo su rendimiento.
- Siempre transportar el microscopio tomándolo con una mano de la base y con la otra del brazo.
- Siempre guardar el aceite de inmersión con tapa y mantenerlo libre de polvo.

4.3. OBSERVACIÓN DE MUESTRAS

4.3.1. Propósito

Describir el procedimiento para la correcta detección e identificación de parásitos del paludismo en preparados sanguíneos coloreados con Giemsa por microscopía óptica.

4.3.2. Introducción

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

4.3.3. Materiales

- Microscopio compuesto, con oculares de 10x; Objetivos 10x, 40x y 100x y platina mecánica
- Preparados sanguíneos coloreados con Giemsa para ser examinados
- Aceite de inmersión de alta calidad

4.3.4. Procedimiento

Se empleará el siguiente esquema de revisión sistemática de láminas:



Esquema de revisión sistemática de láminas

Exploración de la gota gruesa

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

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

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

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

Exploración del extendido hemático

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

Los extendidos hemáticos no se examinan de forma sistemática para establecer el diagnóstico del paludismo en un paciente. Se recomienda cuando la gota gruesa es demasiado pequeña, se perdió durante la tinción, se autofijó o no es examinable por cualquier otro motivo. También se pueden examinar los extendidos hemáticos cuando la confirmación de la especie en la gota gruesa resulta difícil o no es segura, y cuando la densidad de parásitos es muy elevada. Dar un resultado negativo mediante la examinación del frotis precisa más tiempo que a partir de la gota gruesa, pues requiere de una observación de 800 campos como mínimo.

4.4. LOS COMPONENTES DE LA SANGRE

El aspecto normal de los diversos componentes de la sangre es siempre ligeramente diferente en la gota gruesa y el extendido hemático, y es importante poder reconocerlos.

4.4.1. Sangre en extendidos hemáticos coloreados con Giemsa

Se observan glóbulos rojos (eritrocitos o hematíes), glóbulos blancos (leucocitos) y plaquetas (trombocitos).

Eritrocitos, hematíes o glóbulos rojos

Los glóbulos rojos tienen forma de disco bicóncavo. Son las células más abundantes en los extendidos hemáticos. Hay aproximadamente 5 millones en cada microlitro de sangre. Con la tinción de Giemsa el glóbulo rojo tiene el aspecto de un disco gris pálido o rosa claro de aproximadamente 7.5 μm de diámetro, sin núcleo.

Leucocitos o glóbulos blancos

El número de glóbulos blancos es muy inferior al de glóbulos rojos: unos 6000 a 8000 por microlitro. Existen diferentes tipos de leucocitos los cuales se colorean de manera diferenciada.

En el extendido hemático se les puede reconocer el núcleo, el citoplasma y la membrana celular. Cada glóbulo blanco tiene un núcleo rodeado de citoplasma; a veces el citoplasma es granular. Los leucocitos pueden dividirse en dos grupos: polimorfonucleares y mononucleares.

Leucocitos polimorfonucleares

Neutrófilos: En personas sanas representan un 65% de la totalidad de los glóbulos blancos. Su citoplasma posee gránulos bien definidos y el núcleo se tiñe de color púrpura oscuro. En algunos casos de paludismo se pueden observar neutrófilos conteniendo pigmento malárico, como un producto final de la fagocitosis de los parásitos.

Eosinófilos. En personas sanas representan un 1 a 4% de la totalidad de los glóbulos blancos. Sus gránulos son de un color rosado característico.

Basófilos. Son infrecuentes, y no llegan al 1% de la totalidad de los glóbulos blancos. Con la tinción de Giemsa el citoplasma muestra grandes gránulos de color azul o morado pálido.

Leucocitos mononucleares

Monocitos. Corresponden a 2-10% del total de leucocitos de una persona sana. Son los leucocitos de mayor tamaño, con un diámetro de 12 a 18 μm . El núcleo es grande y tiene forma de riñón o frijol; el citoplasma puede contener escasos gránulos que se tiñen de rosa o rojo. Al igual que los neutrófilos, fagocitan activamente los plasmodios.

Linfocitos. Los dos tipos de linfocitos, grandes y pequeños, corresponden a 20-45% del total de leucocitos de una persona sana. El núcleo de los linfocitos grandes es redondo y de color morado intenso. El abundante citoplasma se tiñe de azul claro y puede contener algunos gránulos de color malva. Los linfocitos pequeños son ligeramente mayores que un glóbulo rojo normal, con escaso citoplasma alrededor del núcleo que se tiñe de azul oscuro.

Plaquetas

Las plaquetas son pequeñas, irregulares, sin núcleo, y con una fina granulación roja sobre un fondo azulado. Su número es de unas 100000 por microlitro de sangre y generalmente aparecen en grupos de 5 a 10.

4.4.2. Sangre en gotas gruesas coloreadas con Giemsa

Al examinar una gota gruesa se observan restos de glóbulos rojos y glóbulos blancos y plaquetas.

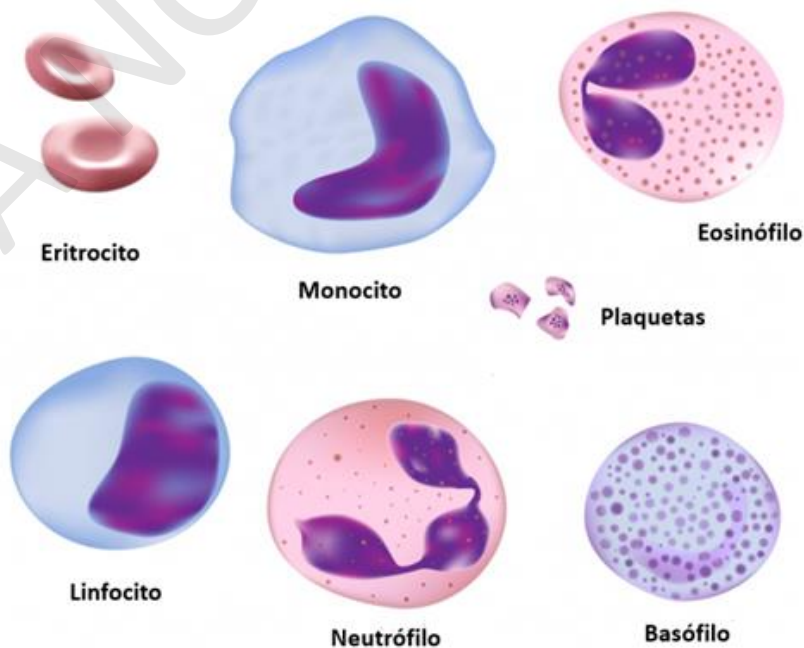
El proceso de deshemoglobinización ocurre mientras la gota gruesa se colorea con el colorante Giemsa produciendo que la hemoglobina sea disuelta dejando solamente restos de su estructura.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Los glóbulos blancos y las plaquetas tienen un aspecto muy parecido al observado en los extendidos hemáticos. En general, los leucocitos se observan más pequeños, con el citoplasma más compacto alrededor del núcleo, porque no han sido extendidos en una sola capa sobre la lámina.

Coloración que adquieren los elementos celulares

Tipo de Célula	Coloración con Giemsa
Linfocitos	Núcleo azul violeta, citoplasma azul
Monocitos	Núcleo azul violeta, citoplasma azul claro
Neutrófilos	Núcleo púrpura o azul oscuro, citoplasma rosa pálido, gránulos rosados a azul claro
Basófilos	Núcleo púrpura o azul oscuro, gránulos azul oscuro a negro
Eosinófilos	Núcleo azul, citoplasma rosa pálido, gránulos de color rosado característico
Plaquetas	Tono azulado
Eritrocitos	Gris pálido a rosa



Componentes celulares sanguíneos coloreados en extendido hemático

CAPÍTULO 5: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS PLASMODIOS

5.1. RECONOCIMIENTO DEL PARÁSITO

Para identificar las especies de *Plasmodium* que parasitan al hombre, se deben reconocer sus características morfológicas en sus diferentes estadios de desarrollo (gota gruesa y extendido hemático) y su efecto sobre los glóbulos rojos parasitados (extendido hemático).

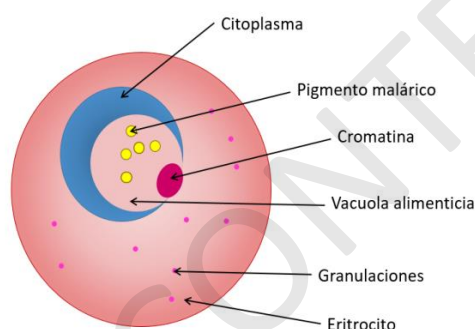
En la gota gruesa, los parásitos se observan en forma libre, sin embargo, en el extendido hemático, los parásitos se observan dentro de los eritrocitos, cuya morfología y tamaño pueden verse afectados según la especie de parásito infectante.

5.1.1. Las partes de los plasmodios

La tinción de Giemsa colorea de forma distinta las diferentes partes de los plasmodios. Los plasmodios pasan por una serie de fases de desarrollo en las que su forma sufre grandes cambios. Sin embargo, los colores de los que se tiñen las diferentes partes del parásito son siempre los mismos en las diferentes fases.

Los parásitos se observan con una cromatina redonda, de color rojo; el citoplasma adquiere diferentes formas, dependiendo del estadio y especie, pudiendo tener forma de anillo, redondeada, con forma de banana o completamente irregular, adquiriendo una coloración azulada, cuya intensidad varía entre diferentes especies del parásito. Además, es posible visualizar el pigmento malárico característico o hemozoína, producto del metabolismo del parásito y que no se colorea, pero tiene su propio color, que puede ir desde un amarillo pálido hasta marrón oscuro o negro.

En los eritrocitos parasitados puede observarse un punteado como efecto del parásito en la célula huésped, cuya observación depende de la calidad del colorante, el pH del buffer y el tiempo de coloración. Éste punteado son las “granulaciones de Schüffner”, que aparecen en casos de infección por *P. vivax* como un punteado rosado; en las infecciones por *P. ovale*, el punteado casi morado recibe el nombre de “puntos de James” (aunque se los sigue llamando “punteado de Schuffner”); las “granulaciones de Maurer” que se observan en los extendidos en algunas células parasitadas por *P. falciparum*, son más difíciles de demostrar; las “granulaciones de Ziemann” en algunos eritrocitos parasitados por *P. malariae*.



Partes de un plasmodio dentro de un eritrocito

5.1.1. Los estadios de los plasmodios

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

Trofozoítos

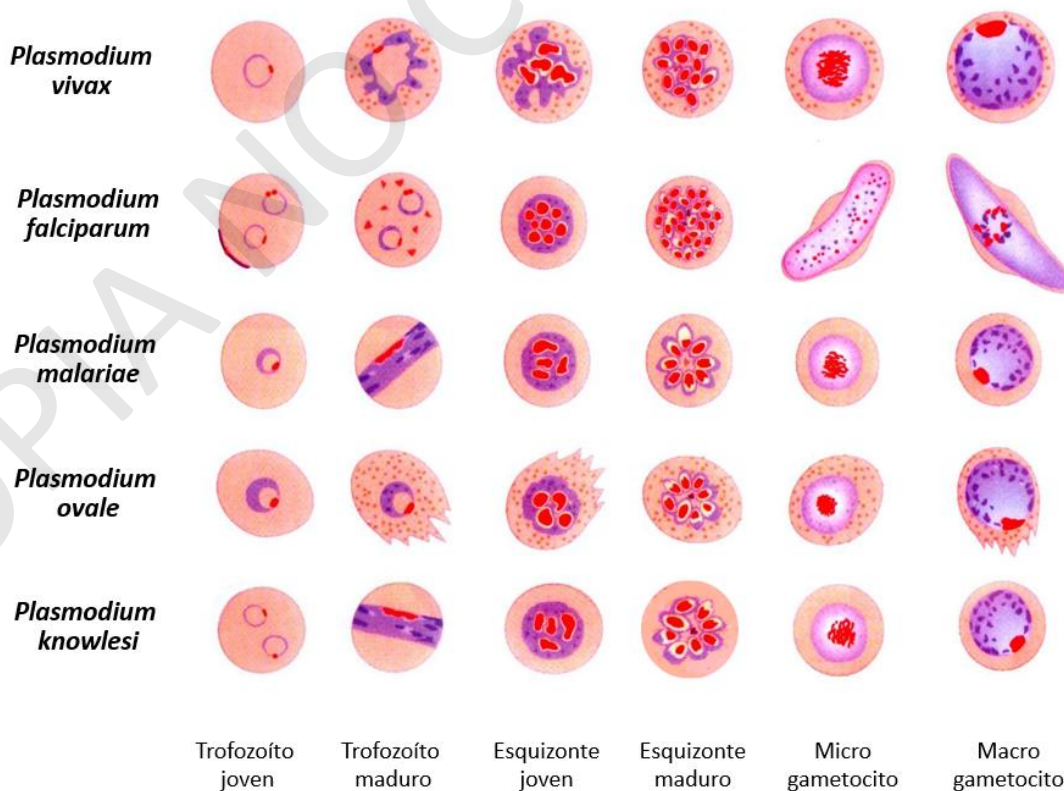
Son los estadios que se encuentran con mayor frecuencia durante la examinación de las muestras de sangre. También se los llama anillos en su forma joven. El trofozoíto en el interior de la célula huésped puede ser pequeño o muy grande. Generalmente hay una mancha de cromatina; cuando se trata de *P. falciparum* es frecuente que haya dos. El trofozoíto va aumentando de tamaño creciendo dentro del glóbulo rojo, y a medida que esto ocurre va apareciendo el pigmento malárico y el citoplasma adopta diferentes formas.

Esquizonte

El parásito en esta fase empieza a reproducirse de forma asexual dentro del eritrocito. Se producen varias divisiones de la cromatina, que denotan el crecimiento del esquizonte, hasta que hay muchos cuerpos cromatínicos, cada uno de ellos con su citoplasma. El número de núcleos observados pueden ser de utilidad para determinar la especie. Estos nuevos parásitos claramente definidos (merozoítos) están ahora listos para abandonar la célula huésped e invadir nuevos glóbulos rojos.

Gametocito

Consiste en el estadio sexual, que puede ser hembra (macrogametocito) o macho (microgametocito). La morfología de los gametocitos depende de la especie, pueden tener forma redonda o forma de banana o luna creciente. La forma como el parásito capta la tinción ayuda a identificar su sexo en los extendidos hemáticos.



Estadíos según especie de plasmodio

5.2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS SEGÚN ESPECIES DE *PLASMODIUM*

La identificación de la especie de *Plasmodium* infectante se basa en el aspecto morfológico que el mismo presenta en la gota gruesa y el extendido hemático, y el efecto que producen en los glóbulos rojos.

En extendido hemático deben observarse los eritrocitos infectados y los parásitos dentro de ellos, en cuanto a tamaño y forma. Resulta de gran utilidad para la diferenciación de la especie del parásito, pues el efecto que los parásitos producen sobre el glóbulo rojo (aumentado o no de tamaño, o distorsionado) es característico para cada una.

En gota gruesa los glóbulos rojos quedan lisados, de manera que el diagnóstico se basa en el aspecto del parásito. Los organismos suelen ser más compactos y densos que en el extendido hemático. Los parásitos y los componentes normales de la sangre se observan más pequeños que en el extendido y el citoplasma fino de los trofozoítos más jóvenes puede estar incompleto o interrumpido.

A continuación se presentan las principales características de las cinco especies de plasmodios que infectan al hombre, observadas en extendidos hemáticos y gotas gruesas coloreados con Giemsa.

Se recomienda el empleo como material de apoyo de los gráficos auxiliares de OMS para el diagnóstico microscópico del paludismo (Medios auxiliares para el diagnóstico de las infecciones palúdicas), así como los gráficos y las láminas fotográficas de CDC disponibles en anexos para la identificación de plasmodios.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

5.2.1. *Plasmodium vivax*

Estadio	Extendido hemático	Gota gruesa	Gráfico
Trofozoito joven	Tamaño: 2 a 3 µm de diámetro (1/3 del diámetro del glóbulo rojo)	Tamaño: pequeños a grandes	
	Número: moderado; 1 por glóbulo rojo	Número: escaso a moderado	
	Forma: irregularmente redondeado	Forma: anillo roto o formas irregulares	
	Citoplasma: dispuesto regularmente en forma de anillo alrededor de la vacuola	Citoplasma: irregular o fragmentado	
	Cromatina: punto único importante	Cromatina: botón simple bastante grande	
	Pigmento: gránulos finos difíciles de distinguir distribuidos principalmente alrededor de la vacuola	Pigmento: difícil de distinguir	
Trofozoito maduro	Tamaño: grande. No es posible medirlo pues los pseudópodos tienden a ocupar el glóbulo rojo infectado	Tamaño: grande	
	Número: moderado	Número: moderado	
	Forma: ameboide, irregular	Forma: compactas, densas	
	Citoplasma: en jirones, unidos por finos puentes apenas visibles. Retiene 1 o más vacuolas	Citoplasma: irregular, fragmentado	
	Cromatina: condensada como punto importante	Cromatina: punto único importante	
	Pigmento: en forma de bastones finos, cortos, visibles	Pigmento: fino y desperdigado	
Esquizonte joven	Tamaño: grande	Tamaño: grande	
	Número: moderado	Número: moderado	
	Forma: ameboide, irregular	Forma: compacta	
	Citoplasma: condensado, escasa vacuola	Citoplasma: fragmentado	
	Cromatina: fragmentada en segmentos grandes	Cromatina: fragmentada	
	Pigmento: en forma de bastones finos	Pigmento: discreto, suavemente concentrado en 1 o 2 áreas	
Esquizonte maduro	Tamaño: aproximadamente 8 µm, ocupa la mayor parte del glóbulo rojo	Tamaño: grande	
	Número: pocos a moderados	Número: escaso a moderado	
	Forma: redondeada, con 12 a 24 merozoítos grandes	Forma: con 16 merozoítos en promedio en conglomerado irregular	
	Citoplasma: organizado alrededor de cada gránulo de cromatina, desaparece vacuola	Citoplasma: en cada merozoíto	
	Cromatina: en cada merozoíto como gránulo único	Cromatina: en cada merozoíto	
	Pigmento: condensado en cualquier punto del parásito formando un bloque único (coalescente)	Pigmento: aparece como una masa suelta	
Gametocito	Tamaño: 4 a 7 µm de diámetro	Tamaño: grande	
	Número: cantidad variable según cepas	Número: pocos a moderado	
	Forma: redondeado	Forma: redondeada	
	Citoplasma: denso, con diferencias tintoriales según sexo	Citoplasma: denso, pero pueden aparecer formas erosionadas donde no se observa citoplasma (sólo cromatina y pigmento)	
	Cromatina: compacta, excéntrica	Cromatina: única, bien definida en el femenino y difusa en el masculino	
	Pigmento: difuso y granuloso	Pigmento: fino y desperdigado	
Glóbulo rojo infectado	1.5 a 2 veces mayor de lo normal Forma oval a normal. Granulaciones de Schüffner finas presentes (poco abundantes en trofozoito joven y abundantes en el resto de los estadios)	Granulaciones de Schüffner en fantasma de eritrocitos, especialmente en el borde del preparado	

Diagnóstico laboratorial de paludismo

5.2.2. *Plasmodium falciparum*

Estadio	Extendido hemático	Gota gruesa	Gráfico
Trofozoíto joven	Tamaño: pequeño y delicado; 1 a 2 μm de diámetro	Tamaño: pequeño	
	Número: puede haber dos o más anillos por glóbulo rojo	Número: abundante	
	Forma: de anillo; formas adheridas frecuentes, formas de herradura	Forma: anulares, en coma y de herradura	
	Citoplasma: forma de anillo delgado, pero también puede disponerse como una masa paranuclear o como una cinta rodeando el glóbulo rojo. Vacuola bien desarrollada	Citoplasma: anillo, coma, signo de exclamación	
	Cromatina: gránulos pequeños, 1 o 2, excéntrico, frecuentemente hace saliente fuera de la línea general del anillo ("anillo de sello")	Cromatina: a menudo 2 gránulos	
	Pigmento: no se observa	Pigmento: no se observa	
Trofozoíto maduro	Tamaño: aproximadamente 2 μm	Tamaño: moderado	
	Número: muy escasos	Número: muy escasos	
	Forma: anillo	Forma: anillo	
	Citoplasma: anillo ancho que puede estar más engrosado en una dirección, dando aspecto en llama de vela, red de mariposa, chal	Citoplasma: compacto	
	Cromatina: gránulo simple o doble a veces en forma de haltera	Cromatina: gránulo simple o doble	
	Pigmento: en gránulos	Pigmento: pocos gránulos gruesos	
Esquizonte joven	Tamaño: moderado	Tamaño: moderado	
	Número: No se observan en sangre periférica excepto en infecciones severas; las fases de desarrollo que siguen a la forma de anillo ocurren en los capilares de las vísceras	Número: No se observan en sangre periférica excepto en infecciones severas; las fases de desarrollo que siguen a la forma de anillo ocurren en los capilares de las vísceras	
	Forma: irregular	Forma: compacto, oscuramente teñido	
	Citoplasma: denso, homogéneo, y se condensa secundariamente alrededor de las masas nucleares	Citoplasma: llena los espacios entre los fragmentos de cromatina como una cubierta incompleta	
	Cromatina: en segmentos que pueden estar escondidos	Cromatina: segmentos claramente definidos	
	Pigmento: agrupado en la zona central	Pigmento: fusionado en una masa oscura simple	
Esquizonte maduro	Tamaño: 5 a 6 μm de diámetro	Tamaño: pequeño a moderado	
	Número: No se observan en sangre periférica excepto en infecciones severas	Número: No se observan en sangre periférica excepto en infecciones severas	
	Forma: masa redondeada	Forma: redondeada	
	Citoplasma: con merozoítos (8-40) pequeños y ausencia de vacuola	Citoplasma: rodeando a la cromatina, formando los merozoítos agrupados o desperdigados	
	Cromatina: en bloques de tamaño y forma múltiple; secundariamente esos fragmentos se organizan en gránulos idénticos en número de 8-40	Cromatina: gránulos uniformes, ovals o redondeados	
	Pigmento: en masa única	Pigmento: masa coalescente única oscura	
Gametocito	Tamaño: 8-10 μm x 2-6 μm	Tamaño: moderado, largo	<p>♀ </p> <p>♂ </p>
	Número: dependiente de la cepa y antigüedad de la infección	Número: dependiente de cepa y antigüedad de la infección	
	Forma: semilunar o elipse irregular	Forma: formas inmaduras puntiagudas poco corrientes; formas maduras semilunares	
	Citoplasma: sin vacuola, con características tintoriales según sexo	Citoplasma: con características tintoriales según sexo; oscuro en el femenino; pálido en el masculino	
	Cromatina: central y densa en el femenino (puede estar oculta por el pigmento); menos densa y difusa en el masculino	Cromatina: bien definida en el femenino; difusa en el masculino	
	Pigmento: color castaño oscuro en forma de gránulos irregulares o de bastoncitos cortos; condensado en el núcleo en el femenino; distribuido en todo el citoplasma en el masculino	Pigmento: concentrado cerca del centro en el femenino; disperso y granular en el masculino	
Glóbulo rojo infectado	Tamaño y forma normal. Pueden observarse granulaciones de Maurer. Puede estar distorsionado con crenación.	Se pueden observar fantasmas de glóbulos rojos	

Diagnóstico laboratorial de paludismo

5.2.3. *Plasmodium ovale*

Estadio	Extendido hemático	Gota gruesa	Gráfico
Trofozoíto joven	Tamaño: semejante al anillo de <i>P. vivax</i>	Tamaño: semejante a <i>P. vivax</i>	
	Número: escaso; 1 anillo por glóbulo rojo	Número: escaso	
	Forma: anular, redondeada, compacta	Forma: anular o redondeada	
	Citoplasma: regular	Citoplasma: bastante regular y grueso	
	Cromatina: única y prominente	Cromatina: única, grande	
	Pigmento: desperdigado	Pigmento: rugoso, distribuido en el citoplasma	
Trofozoíto maduro	Tamaño: 3 a 5 µm	Tamaño: pequeño a mediano	
	Número: generalmente escaso	Número: escaso	
	Forma: redondeada u ovalada, no amebode	Forma: redondeada, regular	
	Citoplasma: denso, sin pseudópodos, y vacuola pequeña	Citoplasma: compacto	
	Cromatina: única, a menudo alargada	Cromatina: en punto único	
	Pigmento: marrón oscuro	Pigmento: oscuro a negro	
Esquizonte joven	Tamaño: 3 a 5 µm	Tamaño: menor que <i>P. vivax</i>	
	Número: moderado a escaso	Número: escaso	
	Forma: compacta	Forma: redondeada	
	Citoplasma: condensado, sin vacuola	Citoplasma: distribuido alrededor de los puntos de cromatina	
	Cromatina: fragmentada	Cromatina: en segmentos	
	Pigmento: abundante	Pigmento: oscuro	
Esquizonte maduro	Tamaño: 3 a 5 µm; ocupa ¼ de la célula	Tamaño: menor que <i>P. vivax</i>	
	Número: generalmente escaso	Número: escaso	
	Forma: compacta con 6 a 12 merozoítos en rosácea o clusters irregulares	Forma: con 6-12 merozoítos	
	Citoplasma: distribuido alrededor de los gránulos de cromatina	Citoplasma: alrededor de los gránulos de cromatina	
	Cromatina: fragmentada en número de 6-12 puntos (generalmente 8)	Cromatina: en puntos (6-12)	
	Pigmento: agrupado en masa única	Pigmento: masa concentrada	
Gametocito	Tamaño: 4 a 6 µm	Tamaño: menor que <i>P. vivax</i>	
	Número: escaso	Número: escaso	
	Forma: redondeada	Forma: compacta, redondeada	
	Citoplasma: denso	Citoplasma: denso	
	Cromatina: única	Cromatina: única, bien definida	
	Pigmento: desperdigado	Pigmento: rugoso y difuso	
Glóbulo rojo infectado	Agrandado, algunas veces distorsionado, con extremos fibrilados o forma oval. Con granulaciones de James prominentes a lo largo del borde de la célula	Granulaciones de James prominentes en eritrocitos "fantasmas" huéspedes, especialmente en los bordes del preparado	

Diagnóstico laboratorial de paludismo


5.2.4. *Plasmodium malariae*

Estadio	Extendido hemático	Gota gruesa	Gráfico
Trofozoíto joven	Tamaño: pequeño (menor que <i>P. vivax</i>); ocupa 1/8 del glóbulo rojo; 1,5 a 3 µm	Tamaño: pequeño	
	Número: escaso; 1 anillo por glóbulo rojo	Número: generalmente escaso	
	Forma: anillo con cierta tendencia a deformarse; puede ser ovalado e inclusive tomar aspecto más deformado (ej.: en gancho)	Forma: anular o redondeada	
	Citoplasma: condensado en una sola dirección y tiende precozmente a formar una banda ecuatorial a través del hematíe; con vacuola	Citoplasma: irregular	
	Cromatina: única, ovalada, en el interior del anillo	Cromatina: única, grande	
	Pigmento: esparcido en el citoplasma	Pigmento: desperdigado, abundante, con tono amarillento	
Trofozoíto maduro	Tamaño: 3 a 4 µm de lado	Tamaño: mayor que el trofozoíto joven	
	Número: moderado	Número: moderado a bajo	
	Forma: rígida, en cuadrilátero compacto, en banda ecuatorial en la parte media del glóbulo rojo	Forma: compacta, redondeada	
	Citoplasma: denso y sin vacuola	Citoplasma: contraído alrededor de la cromatina en forma redondeada, oval o de banda; desaparece la vacuola	
	Cromatina: grande, densa, puede estar escondida por el pigmento	Cromatina: grande, densa, en masa única	
	Pigmento: abundante, granuloso, con tendencia a distribuirse en la periferia	Pigmento: muy abundante	
Esquizonte joven	Tamaño: aproximadamente 6 µm	Tamaño: grande	
	Número: escaso	Número: escaso	
	Forma: redondeada	Forma: menos compacta que trofozoíto maduro	
	Citoplasma: fragmentado	Citoplasma: en trozos	
	Cromatina: fragmentada en gránulos individuales	Cromatina: segmentada en tamaño y formas irregulares	
	Pigmento: en gránulos dispersos en periferia o centro	Pigmento: desperdigado como pequeños gránulos	
Esquizonte maduro	Tamaño: 4 a 6 µm	Tamaño: moderado	
	Número: generalmente escaso	Número: escaso	
	Forma: masa redondeada de aspecto cada vez más regular a medida que se organiza la rosácea. Con 6 a 12 merozoítos (habitualmente 8) que forman el "cuerpo en margarita"	Forma: compacta con 6-12 merozoítos en conglomerado laxo	
	Citoplasma: denso, acumulado alrededor de cada gránulo de cromatina, escaso	Citoplasma: cubriendo el núcleo de cada merozoíto	
	Cromatina: repartida, distribuida armoniosamente alrededor de un centro	Cromatina: óvalo oscuro en cada merozoíto	
	Pigmento: forma un corpúsculo central	Pigmento: colección compacta de gránulos, color marrón verdoso	
Gametocito	Tamaño: 4 a 6 µm de diámetro	Tamaño: moderado	
	Número: cantidad variable, generalmente bastante escasos	Número: escasos	
	Forma: redonda	Forma: compacta, redondeada u oval	
	Citoplasma: bastante denso, sin vacuola	Citoplasma: denso	
	Cromatina: de densidad variable según sexo	Cromatina: masa única redonda o irregular en le femenino; difusa en el masculino	
Pigmento: gránulos que tienden a condensarse en la periferia	Pigmento: distribuido en gránulos con arreglo periférico		
Glóbulo rojo infectado	Forma normal. Tamaño normal o retraído, con granulaciones de Ziemann	Generalmente no se observan los fantasmas de glóbulos rojos	

Diagnóstico laboratorial de paludismo

5.2.5. *Plasmodium knowlesi*

Estadio	Extendido hemático	Gota gruesa	Gráfico
Trofozoíto joven	Tiene forma de anillo similares a <i>P. falciparum</i> . Pueden mostrar puntos dobles de cromatina. Pueden aparecer anillos rectangulares que albergan uno o más gránulos de cromatina. Los glóbulos rojos también pueden estar infectados de forma múltiple. Puede haber dos o tres parásitos por glóbulo rojo. Cuando maduran, los anillos no ameboides pueden ocupar la mitad o más del glóbulo rojo. Citoplasma denso; cromatina 1 o 2 gránulos, ocasionalmente 3, dentro del anillo. Pigmento: no se observa	Citoplasma denso; cromatina 1 o 2 gránulos, ocasionalmente 3, dentro del anillo	
Trofozoíto maduro	Pueden aparecer formas en banda similares en apariencia a <i>P. malariae</i> . Como la vacuola se pierde durante la maduración, el parásito se vuelve más pequeño y más compacto. El pigmento aparece como granos oscuros y el núcleo aumenta de tamaño. Citoplasma denso, ameboides e irregular, formas en banda, pigmento marrón oscuro	Citoplasma denso, ameboides e irregular, formas en banda.	
Esquizonte	El núcleo se divide hasta que haya 16 (promedio de 10) merozoítos. A medida que el esquizonte madura, llena el glóbulo rojo y el pigmento se acumula en una o unas pocas masas. En el esquizonte maduro, los merozoítos pueden aparecer "segmentados" y el pigmento se ha acumulado en una sola masa.	Con 10-16 merozoítos dispersos o en racimo.	
Gametocito	Los macrogametocitos suelen ser esféricos y llenan el glóbulo rojo. El citoplasma se tiñe de azul y el núcleo excéntrico se tiñe de rojo. El pigmento es grueso y negro, y está disperso irregularmente en el citoplasma. El microgametocito es a menudo, pero no siempre, más pequeño que el macrogametocito. El citoplasma generalmente se tiñe de un rosa pálido, mientras que el núcleo se tiñe de un rojo más oscuro. El núcleo puede constituir la mitad del parásito. El grueso pigmento negro está disperso de forma irregular en el citoplasma.	Redondeado, compacto.	
Glóbulo rojo infectado	Tamaño y forma normal. No distorsionado. Aparecerá punteado de Sinton y Mulligan.	Se pueden observar fantasmas de glóbulos rojos	

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 48 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

5.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El examen de preparados hemáticos permite también la detección de varios patógenos sanguíneos e identificación de varios trastornos hematológicos, que deben ser informados por el microscopista.

Las muestras de sangre, gota gruesa y extendido hemático, pueden demostrar algunas características que producen confusión y dificultan el diagnóstico. Estas características se conocen como artefactos y entre ellos se encuentran los hongos, partículas de polvo, suciedad, células vegetales y bacterias.

La examinación de muestras de sangre periférica permite también el diagnóstico de otros parásitos o microorganismos como *Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp., microfilarias, *Histoplasma capsulatum*, entre otros, en base a sus características morfológicas y a la coloración diferencial de sus componentes, para lo cual se necesita que la lámina sea preparada y coloreada de forma adecuada, que el observador sea un microscopista capacitado y que se observe la cantidad de campos necesarios, a fin de otorgar un diagnóstico certero.

Se recomienda el empleo como material de apoyo de las láminas fotográficas disponibles en anexos para diagnóstico diferencial.

5.3.1. Artefactos que aparecen regularmente en las extensiones de sangre

Hongos

Están entre los artefactos comunes. La mejor manera de prevenirlos es utilizar reactivos no contaminados (láminas, agua, soluciones) y colorear las muestras dentro de 48 horas de haber sido tomadas.

Polen y esporas transportados por el aire

Se asientan fácilmente en las extensiones de sangre recién hechas, todavía húmedas. Si las esporas se asientan antes de que la extensión este seca, pueden captar la tinción, aumentando todavía mas la confusión durante el examen. El secado de las extensiones en una caja de portaobjetos ayuda a evitar este tipo de contaminación.

Suciedad y bacterias

Si el dedo del paciente no está bien limpio o el portaobjetos no está perfectamente limpio, pueden introducirse bacterias o suciedad en la extensión de sangre. La buena higiene personal del paciente y el uso de guantes por parte del trabajador sanitario contribuirán a evitar este problema.

Agua contaminada

Cualquier contaminante orgánico que este en esa agua puede pasar a la extension, causando dudas diagnósticas. Este problema puede evitarse hirviendo y filtrando el agua.

5.3.2. Otros parásitos o microorganismos

Trypanosoma spp.

En nuestra región la especie autóctona que infecta al hombre es *Trypanosoma cruzi*. Los tripomastigotes de *T. cruzi* tienen una longitud de 12-30 μm , poseen un núcleo central y un kinetoplasto subterminal en el extremo posterior del parásito. El flagelo, adherido al cuerpo a través de una membrana ondulante, abandona el cuerpo en el extremo anterior. La porción libre del flagelo mide de 2-11 μm de largo.

Babesia spp

Este parásito, al igual que *Plasmodium*, infecta eritrocitos. Tiene formas múltiples: anillo, pera, huso, redonda, ameboide. Puede observarse individual, en parejas o múltiples de dos (tétradas), dependiendo de la especie. El tamaño puede variar de 1-5 μm .

Microfilarias

Existen ocho especies de filarias que infectan varios tejidos del ser humano. Los parásitos pueden vivir varios años y las hembras producen microfilarias que circulan por la sangre y otros tejidos. En nuestro país la única especie que produce casos autóctonos es *Mansonella ozzardi*. Esta microfilaria no tiene vaina, mide 163-203 μm por 3-4 μm y posee una cola delgada cuyos núcleos no se extienden hasta el final.

Leishmania spp.

Los amastigotes de *Leishmania spp.* se pueden observar libres o intracelulares en monocitos. Tienen una forma esférica a ovoide, tamaño de 1-5 μm de largo y 1-2 μm de ancho, y contienen un núcleo grande y un kinetoplasto.

Histoplasma capsulatum

Las esporas de *H. capsulatum* no deben confundirse con amastigotes. Se pueden observar libres o intracelulares en leucocitos polimorfonucleares o mononucleares, tienen una forma esférica a ovoide, tamaño de 2-4 μm de largo, y contienen un núcleo grande.

5.3.3. Anormalidades de los eritrocitos

Anormalidades del tamaño

Los eritrocitos normocíticos presentan las siguientes dimensiones: diámetro longitudinal 7-8 μm , diámetro periférico 2 μm , diámetro central 1 μm , superficie: 120-140 μm^2 , volumen 80-100 μm^3 .

Anisocitos: eritrocitos de diferente tamaño en una misma muestra. Presentan dimensiones extremadamente variables.

Microcitos: eritrocitos con un diámetro longitudinal inferior a 7 μm y un volumen inferior a 80 μm^3 .

Macrocitos: eritrocitos con un diámetro longitudinal superior a 8 μm y un volumen superior a 100 μm^3 .

Megalocitos: eritrocitos con un diámetro longitudinal superior a 11 μm .

Anormalidades de la forma

Los hematíes normocíticos poseen una forma de disco bicóncavo sin núcleo.

Poiquilocitos: hematíes desiguales o variables en la forma en una misma muestra.

Dacriocitos: hematíes maduros de forma ovalada con un extremo agudo (en forma de lágrima, gota o pera).

Acantocitos: hematíes con espículas de longitud y posición irregular.

Dianocitos o codocitos: hematíes planos y con una forma de campana o de sombrero mexicano. Esto hace que los hematíes, vistos frontalmente, tengan un reborde coloreado, que delimita una zona anular pálida, cuyo centro también está coloreado.

Drepanocitos: Hematíes con una forma de hoz, luna creciente o canoa.

Eliptocitos: hematíes con una forma elíptica y oval.

Equinocitos: hematíes con espículas cortas y distribuidas regularmente a lo largo de toda su superficie, también llamados estereocitos o astrocitos.

Esferocitos: hematíes con una forma esférica que carecen de área central pálida. Habitualmente también son de pequeño tamaño (microesferocitos).

Esquistocitos: hematíes fragmentados. Si adoptan la forma de cascos se los conoce como células de Helmet.

Estomatocitos: hematíes con una invaginación central en forma de boca. Estos eritrocitos son realmente discos unicóncavos.

Excentrocitos: hematíes cuya hemoglobina está concentrada en uno de sus polos. Se produce en el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

Keratocitos: hematíes con una o varias muescas con proyecciones o astas.

Leptocitos: eritrocito delgado, plano, con hemoglobina en la periferia.

Nizocitos: eritrocitos con más de dos concavidades; con bastoncillo obscuro de hemoglobina en el centro con un área pálida en los dos extremos.

Anormalidades del color

Los hematíes normocrómicos presentan una coloración rosada (eosinófila). Además, esta coloración es más intensa en la periferia que en el centro.

Anisocromía: falta de uniformidad en la coloración entre unos hematíes y otros.

Hipocromía: hematíes pálidos y con aumento de la claridad central (hematíes hipocrómicos y anulocitos).

Hipercromía: hematíes más coloreados de lo normal (hematíes hiperocrómicos).

Policromasia: hematíes que presentan una coloración ligeramente basófila. Realmente, estas células son reticulocitos (glóbulos rojos inmaduros).

Inclusiones intraeritrocitarias

Normalmente, los hematíes solo contienen hemoglobina, por lo que en su interior es homogéneo. Sin embargo, en algunas ocasiones se pueden encontrar elementos extraños en su interior.

Sustancia granulofilamentosa o reticulofilamentosa: Procede, fundamentalmente, de restos ribosómicos agregados. Es propia de los reticulocitos.

Cuerpo de Howell-Jolly: es un pequeño residuo nuclear. Consiste en un grumo visible en el interior de los hematíes, excéntrico y que se tiñe, de un color que oscila entre el rojo oscuro y el negro.

Cuerpos de Heinz: son precipitados de hemoglobina. Consisten en una serie de pequeñas granulaciones que se sitúan en general próximos a la membrana celular.

Cuerpos de Pappenheimer: también se llaman gránulos sideróticos. Son acúmulos de hemosiderina unida a proteínas. Consisten en gránulos basófilos.

Puntillado basófilo: pueden ser agregados ribosómicos originados por una degeneración vacuolar del citoplasma o precipitados de cadenas globínicas libres. Consiste en puntitos basófilos, de tamaño variable y dispersos por toda la superficie del eritrocito.

Anillos de Cabot: están formados por restos de la envoltura nuclear o de microtúbulos residuales del huso mitótico. Consisten en una especie de hilos basófilos, que adoptan una forma anular o de ocho y que pueden ocupar toda la periferia celular

Anormalidades en la distribución de los eritrocitos

Rouleaux: Eritrocitos ordenados en pilas; en general se debe a proteínas plasmáticas en exceso.

Aglutinación: Conglomerados irregulares de eritrocitos.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Anormalidades de los eritrocitos					
Anormalidades del tamaño	Anormalidades del color	Anormalidades de la forma		Inclusiones	Anormalidades en la distribución
Normal 	Hipocromía 1+ 	Dianocito 	Acantocito 	Cuerpos de Pappenheimer 	Aglutinación
Microcito 	2+ 	Esferocito 	Esquistocito (célula de Helmet) 	Anillos de Cabot 	Rouleaux
Macrocito 	3+ 	Eliptocito 	Esquistocito 	Puntillado basófilo 	
Macrocito elíptico 	4+ 	Estomatocito 	Dacriocito 	Cuerpo de Howell-Jolly 	
Macrocito hipocrómico 	Policromasia 	Drepanocito 	Equinocito 	Formación de cristales	
	Reticulocito 			HbSC 	HbC

Anormalidades de los eritrocitos

CAPÍTULO 6: DENSIDAD PARASITARIA

6.1. FUNDAMENTOS


La identificación de las especies y estadíos de los parásitos del paludismo y la determinación de su densidad es crucial en el manejo clínico de pacientes con paludismo, ensayos de eficacia de medicamentos, estudios epidemiológicos y programas de control. Por lo tanto, los diagnósticos de paludismo basados en exámenes de sangre deben ser correctos, con un recuento de parásitos exacto.

Existen diferentes razones para realizar recuento de parásitos en preparaciones sanguíneas, tales como:

- conocer la severidad de la infección a nivel individual
- determinar la respuesta al tratamiento antimalárico (mediante monitoreo) a nivel individual
- conocer la severidad a nivel poblacional
- testear sensibilidad de drogas

La magnitud de la parasitemia o densidad parasitaria permite estimar la intensidad de la infección, la que a su vez se puede relacionar con la severidad de las manifestaciones clínicas. En situaciones de transmisión acentuada y estable del paludismo, la adquisición de semi-inmunidad produce una protección clínica de los individuos, quienes podrían no presentar fiebre aún con densidades parasitarias moderadas a altas. En la malaria aguda, la densidad parasitaria permite evaluar la evolución clínica del paciente y el manejo de complicaciones. En la malaria crónica, la parasitemia es generalmente baja pero de larga duración. La parasitemia también proporciona al clínico un dato objetivo para evaluar la respuesta terapéutica y permite en estudios específicos, como los estudios *in vivo*, el monitoreo de la eficacia a las drogas antimaláricas.

La densidad parasitaria se realiza una vez que se haya determinado la especie de *Plasmodium* infectante. Al determinar la parasitemia, se debe informar de manera independiente los estadíos asexuales (trofozoítos y esquizontes) y los estadíos sexuales (gametocitos). En casos

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
Diagnóstico laboratorial de paludismo		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 56 de 210

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

6.2. RECUENTO DE PARÁSITOS

6.2.1. Propósito


Describir el procedimiento para contar parásitos de la malaria en preparaciones de sangre gruesas y delgadas.

6.2.2. Introducción

El método utilizado para determinar la densidad parasitaria es un método cuantitativo que permite estimar la parasitemia en la gota gruesa y en el extendido hemático, que se informa como número de parásitos contados por leucocitos para la gota gruesa o porcentaje de glóbulos rojos parasitados en el extendido hemático. Tanto en la gota gruesa como en el extendido hemático, el cálculo inicial se puede traducir a número de parásitos por microlitro de sangre si conocemos los parámetros hematológicos de los pacientes o utilizamos las constantes recomendadas.

6.2.3. Materiales

- Gota gruesa coloreada o extendido hemático debidamente fijado y coloreado
- Microscopio binocular con ocular 10X y objetivo 100X
- Aceite de inmersión
- Xilol
- Papel tipo tissue
- Dos contadores de células

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 57 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

6.2.4. Procedimiento

1. Realizar los recuentos en gota gruesa. Si no fuera posible porque la calidad de la gota gruesa no lo permite, entonces pasar al extendido hemático.

Criterio de lectura en la gota gruesa:

Utilizando los dos contadores proceder a la observación de la gota gruesa, contando separadamente leucocitos y parásitos.

- a. Si después de 200 leucocitos contados, se identifican 10 o más parásitos, registrar los datos como número de parásitos / 200 leucocitos.
- b. Si después de 200 leucocitos contados, se identifican 1 a 9 parásitos, continuar hasta alcanzar 500 leucocitos y registrar el número de parásitos / 500 leucocitos.
- c. Si el número de parásitos contado es 0, contar 500 campos.
- d. Si el recuento de parásitos resulta el doble respecto de leucocitos, registrar el número de leucocitos / 500 parásitos.

Criterio de lectura en extendido hemático:

Utilizando los dos contadores proceder a la observación del extendido hemático, contando separadamente eritrocitos y parásitos.

- a. Localizar una porción en la cola del extendido en que los campos sean uniformes y se cuenta el número de glóbulos rojos en un campo.
- b. Contar simultáneamente glóbulos rojos parasitados y campos hasta llegar a un número de campos equivalentes a 10000 glóbulos rojos. Los glóbulos rojos infectados por más de un parásito se cuentan como uno. Por ejemplo, si el área escogida contiene 280 glóbulos rojos por campo, se deben contar los parásitos presentes en 36 campos. Si el conteo arroja un resultado de 40 parásitos en 10000 glóbulos rojos, la parasitemia se informa

Diagnóstico laboratorial de paludismo

como 0.4%. Una parasitemia de 1% es una densidad parasitaria elevada y de 5% es hiperparasitemia que puede poner en peligro la vida del paciente.

2. Estimar la densidad parasitaria por microlitro de sangre.

Se debe disponer del conteo de glóbulos rojos y leucocitos del paciente. Si no se dispone de esta información, se asumen concentraciones constantes de 5000000 eritrocitos/ μ l y 6000 – 8000 leucocitos/ μ l.

Estimación en la gota gruesa

Cuando se haya completado el recuento, calcular el número de parásitos en relación al de glóbulos blancos, y se expresa como “número de parásitos por microlitro de sangre”, utilizando esta fórmula matemática simple:

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

Estimación en el extendido hemático

Convertir el número de parásitos relativo a eritrocitos a parásitos/ μ l de sangre, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{ de parasitemia} \times 5000000}{100} = \text{parásitos}/\mu\text{l}$$

Nota: Registrar separadamente formas asexuales (EAS) y gametocitos (ESS). Agregar en el reporte de la gota gruesa EAS/ESS/leucocitos.

CAPÍTULO 7: REGISTRO E INFORME DE RESULTADOS

7.1. MANTENIMIENTO DE REGISTROS

A veces este aspecto de la rutina del trabajo de laboratorio o sobre el terreno se trata de manera informal porque se suele partir del principio de que todo trabajador de laboratorio es competente para rellenar correctamente cualquier formulario. Sin embargo, no es así, y los involucrados deben adquirir práctica suficiente que les permita ser competentes en esta tarea

El Nuevo Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS2.0) es la herramienta informática desarrollada en el marco del Sistema de Información Sanitaria Argentina (SISA) que permite integrar distintas fuentes y estrategias, y contar con la visualización de los actores involucrados de la información integrada necesaria para la mejora tanto de las acciones de nivel comunitario y poblacional, como la calidad de la atención, en todo lo relacionado a los Eventos de Notificación Obligatoria.

Para toda gestión de datos del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS) es necesario ingresar al sistema con una cuenta de usuario que tenga asignados los permisos indicados para tal fin. Asimismo, el Registro SNVS tiene estipuladas condiciones de gestión de la información que el usuario debe conocer y aceptar para operar los formularios.

Los eventos nominales responden a la estrategia de notificación individual, y entre ellos se encuentra paludismo. La notificación comienza con el ingreso del DNI que permite identificar a la persona en el padrón de ciudadanos del SISA. Este tipo de eventos pueden ser notificados por cualquiera de los actores que intervienen en el proceso y en cualquier orden: médico, epidemiólogo o bioquímico. Cualquiera de ellos puede registrar una notificación en la solapa correspondiente y luego actualizar los datos inherentes a su campo de acción, siempre que tenga el permiso específico para la notificación de eventos nominales.

En SNVS existen permisos de gestión para cada grupo de eventos. Para registrar información de una notificación, el usuario debe tener asignado el permiso de gestión específico

del evento. Una vez registrado, deben completarse las solapas Clínica, Laboratorio, Epidemiología y/o Embarazo según las características del evento y las capacidades del usuario que notifica.

El registro adecuado y el informe de los resultados del examen microscópico de las láminas de sangre es muy importante para el manejo clínico de pacientes con paludismo y para la confiabilidad de los datos de vigilancia de paludismo, que son la base para monitorear, evaluar y planificar las intervenciones adecuadas.

El paludismo no se descarta con un solo resultado de microscopía negativo ya que el paciente puede tener una densidad parasitaria tan baja que no sea detectable. Por ello cuando se está examinando un paciente individual de quien se posee evidencia clínica y epidemiológica de paludismo, es necesario tomar una o dos muestras adicionales si la primera gota gruesa es negativa a las 12 - 24 horas. El resultado de la observación microscópica se debe informar en el formulario digital y/o en papel correspondiente y no debe ser escrito sobre la lámina para no alterar el control de calidad.

7.2. REPORTE DE RESULTADOS

Los resultados deben registrados en libros, planillas, formularios o sistema informático que cada unidad de diagnóstico utilice en su práctica habitual. Además, los resultados deberán ser cargados como notificación nominal, solapa Laboratorio del S.N.V.S.

La información que deberán contener todos los registros corresponde a cuatro parámetros, correspondientes a: resultado, especie/s, estadío/s, densidad parasitaria.

7.2.1. Informe de resultado

Resultado negativo: cuando la observación de 500 campos en gota gruesa no ha permitido identificar parásitos.

Resultado positivo: cuando se observa una gota gruesa o un extendido en donde se evidencia la presencia de plasmodios.

7.2.2. Informe de especie/s

Plasmodium vivax, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium knowlesi*, Infección mixta (detallar especies)

7.2.3. Informe de estadio/s


Se deberán informar los estadios presentes para cada especie:

Estadios Asexuales Sanguíneos (EAS): trofozoítos jóvenes, trofozoítos maduros, esquizontes jóvenes, esquizontes maduros.

Estadios Sexuales Sanguíneos (ESS): Gametocitos

7.2.4. Informe de densidad parasitaria

Se debe informar la densidad parasitaria para cada especie y en forma diferenciada para estadios asexuales y sexuales, expresada como EAS/ μ l y ESS / μ l.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 62 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

7.3. SEGUIMIENTO DE CASOS DE PALUDISMO

El seguimiento del paciente con infección por *P. vivax*, con toma seriada de gota gruesa y extendido hemático, observados por microscopía óptica (incluyendo recuento parasitario) para evaluar la eficacia del tratamiento (tratamiento acorde a normas nacionales), se realiza los días 1, 2, 3, 14, 21 y 28 postratamiento y 1 vez al mes durante 6 meses.

El seguimiento del paciente con infección por *P. falciparum* con toma seriada de gota gruesa y extendido hemático, observados por microscopía óptica (incluyendo recuento parasitario) para evaluar la eficacia del tratamiento (tratamiento acorde a normas nacionales), se realiza los días 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 postratamiento. En caso de haber utilizado drogas de vida media prolongada (drogas que no forman parte del tratamiento acorde a normas nacionales) se adicionará una muestra a día 42.

COPIA NO CONTROLADA

SECCIÓN III

TESTS DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO

(TDR)

COPIA NO CONTROLADA

CAPÍTULO 8: ASPECTOS GENERALES DE LOS TDR

8.1. FUNDAMENTOS DE UTILIZACIÓN

Si bien, la microscopía óptica es el estándar de oro en el diagnóstico de paludismo, no siempre puede ser implementado o mantenido con una calidad adecuada, pues requiere de un microscopista entrenado, por lo tanto los TDR resultan de gran utilidad para obtener un diagnóstico oportuno.

Los TDR se basan en la detección del antígenos parasitarios, que se encuentran circulando en la sangre del individuo infectado, mediante la formación de un complejo antígeno-anticuerpo en una fase móvil, la cual migra por una tira de nitrocelulosa embebida a su vez por anticuerpos específicos que capturan el complejo formado, con la obtención de una banda coloreada.

8.1.1. Antígenos blanco

El TDR para paludismo es un dispositivo inmunocromatográfico de flujo lateral para detectar proteínas específicas, es decir, proteína rica en histidina II (HRP II) específica para *P. falciparum*, lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (pLDH) y aldolasa, que se producen durante el desarrollo del parásito en el hospedador humano. Durante este proceso, cantidades crecientes de antígenos HRP2, pLDH y aldolasa se producen y liberan al torrente sanguíneo.

Los antígenos detectados por los TDR son:

Proteína rica en Histidina II (HRP II): es expresada en la membrana de glóbulos rojos parasitados por trofozoítos y gametocitos inmaduros de *P. falciparum*. Puede persistir en circulación hasta dos semanas luego de terminada una terapia antipalúdica efectiva, sin que se detecten parásitos circulantes por microscopía, por lo tanto no puede ser utilizado para evaluar el tratamiento y seguimiento del paciente..

Lactato deshidrogenasa de *Plasmodium* (pLDH): es producida por los estadios asexuales y sexuales dos, con isómeros específicos para cada especie. Existen pruebas específicas para las especies *P. vivax* y *P. falciparum*, y pruebas que detectan las cuatro especies en una misma banda (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*), sin especificar cuál de ellas es la causante de la infección.

Aldolasa: Común en las 4 especies, es decir, no es específica, por lo cual se denomina “pan malárica”. Generalmente se elimina de circulación dentro de 5-6 días pos tratamiento.


8.1.2. Ventajas y desventajas

Ventajas sobre la microscopía óptica:

- Resultado rápido y confiable, en tan sólo 15 a 20 minutos.
- Mayor simplicidad de realización e interpretación
- Realización por personal poco formado
- Factibilidad en terreno
- Como detectan antígenos parasitarios, pueden detectar *P. falciparum* cuando los parásitos están secuestrados en órganos internos.

Desventajas sobre la microscopía óptica:

- Algunos kits comerciales sólo detectan *P. falciparum*.
- Los kits que detectan HRP-II pueden dar resultados positivos hasta dos semanas después de la quimioterapia y ausencia de parásitos en sangre por microscopía.
- Son más costosos que la microscopía óptica
- No son cuantitativos
- No pueden diferenciar *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.
- No pueden ser utilizados para seguimiento del paciente.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 66 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		


8.1.3. Procedimiento general (existen algunas diferencias entre los diferentes kits)

1. Se colecta una gota de sangre por punción digital (2-30 μ l dependiendo del kit) usando diferentes tubos capilares.
2. Se coloca primeramente la sangre en la zona determinada, y luego se colocar el buffer que contiene componentes hemolisantes y un anticuerpo específico marcado para detección visual en la zona designada.
3. Se espera el tiempo correspondiente para la lectura de 15 a 30 minutos dependiendo de la marca.
4. Todos los TDR tienen una línea de control la cual debe marcarse para que el test sea considerado válido. Si esta línea no se marca hay que descartarlo y realizar otro.
5. Si el antígeno investigado está presente, se forma un complejo antígeno/anticuerpo que migra en la membrana por capilaridad hacia reactivos específicos previamente dispuestos en la tira.
6. Si la sangre contiene el antígeno investigado, se observa el complejo antígeno/anticuerpo inmobilizado en la posición de captura e identifica la especie o especies presentes.

8.2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS TDR

Los TDR se basan en la captura mediante anticuerpos marcados con colorante para producir una banda visible en una tira de nitrocelulosa.

Se describen como “dispositivos de diagnóstico in vitro para detección de antígenos mediante inmunocromatografía de flujo lateral”, una clasificación reconocida por las autoridades reguladoras de medicamentos en todo el mundo como una clase de dispositivos médicos. En los tests de detección rápida del paludismo (TDR), si la sangre contiene el antígeno objetivo de la malaria, el anticuerpo marcado con colorante primero se une al antígeno del parásito, y el complejo antígeno-anticuerpo resultante es capturado en la tira por una banda de anticuerpo

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 67 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

unido, formando una línea visible (línea de prueba). Los anticuerpos unidos a la tira de nitrocelulosa son típicamente inmunoglobulina M o G monoclonal de origen animal. Los anticuerpos específicos del antígeno blanco del TDR están ligados a la tira de nitrocelulosa, para constituir la banda de prueba. Anticuerpos dirigidos a los anticuerpos conjugados con colorante (anticuerpos marcados) se unen a la nitrocelulosa para constituir la banda de control. Los "anticuerpos de captura" son los anticuerpos que están unidos a la tira de nitrocelulosa y se unen al complejo antígeno parasitario-anticuerpo y al anticuerpo marcado con colorante. Los "anticuerpos de señal" son anticuerpos libres marcados con colorante que se unen al antígeno del parásito blanco del TDR.

El anticuerpo marcado con colorante específico para el antígeno blanco está presente en el extremo inferior de la tira de nitrocelulosa o en un pozo provisto con la tira. El anticuerpo, también específico para el antígeno blanco, está unido a la tira en una línea delgada (de prueba), y el anticuerpo específico para el anticuerpo marcado está unido a la línea de control.

8.2.1. Hemólisis y reconocimiento de antígenos por anticuerpo conjugado

Una vez que la sangre ha sido transferida a la celda de muestra, el primer paso de la prueba consiste en mezclar la sangre del paciente con un agente de lisis (solución buffer) en el mismo pocillo o en otro pocillo (buffer).

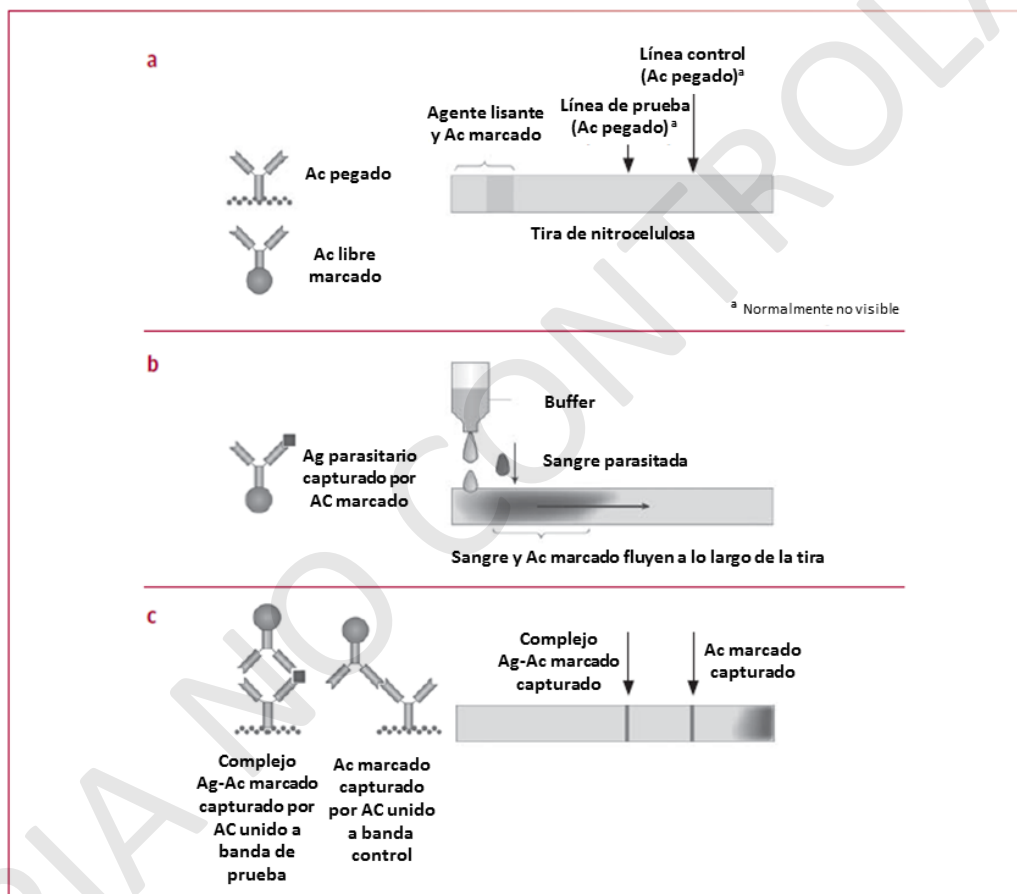
La ruptura resultante de los glóbulos rojos libera más proteína del parásito. El anticuerpo marcado con colorante se puede unir al antígeno blanco.

8.2.2. Migración del conjugado antígeno-anticuerpo

La sangre y el buffer se colocan en los pocillos correspondientes con el anticuerpo marcado y suben por la tira a través de las líneas de anticuerpo unido.

8.2.3. Unión a líneas de prueba y control

Si el antígeno está presente, el complejo anticuerpo-antígeno marcado queda atrapado en la línea o líneas de la prueba. Otro anticuerpo marcado está atrapado en la línea de control. Si se acumula suficiente anticuerpo marcado, las marcas coloreadas se hacen visibles como una línea estrecha.





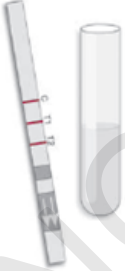



Componentes y mecanismo de los TDR para paludismo

Ag: antígeno; Ac: anticuerpo

8.3. FORMATO DE LOS TDR

8.3.1. Formato de estructura

Los TDR comúnmente vienen en cuatro formatos diferentes: cassette, tira reactiva, tarjeta e híbrido.

<p>Cassette con celdas separadas para sangre y buffer:</p>  <p>Cassette con celda combinada para sangre y buffer:</p> 	<p>Cassette La tira de nitrocelulosa se encuentra dentro de un cassette plástico. Principales características: línea control (C), línea de prueba (T) y celda/s para sangre y buffer.</p>
	<p>Tira reactiva La tira de nitrocelulosa se coloca en celdas conteniendo sangre y buffer.</p>
<p>Tarjeta abierta:</p>  <p>Tarjeta cerrada:</p> 	<p>Tarjeta La tira de nitrocelulosa está inserta en una tarjeta. La sangre y el buffer se colocan en paños absorbentes y la tarjeta se cierra para la lectura.</p>
 <p>↑ ↑ Celdas para sangre y buffer</p>	<p>Híbrido Combina elementos de cassette y tira reactiva. La tira de nitrocelulosa se coloca en celdas y luego se ubica en el cassette para lectura.</p>

Formatos de los TDR

8.3.2. Formato de reacción

Los TDR pueden clasificarse en 9 tipos según los antígenos que detectan y la combinación de los mismos.



Tipo A: TDR para paludismo por *P. falciparum*

Ventana de resultados: C, línea control; T, línea de prueba con Ac anti HRP-2 pegado



Tipo B: TDR para paludismo por las principales especies de *Plasmodium* (pan)

Ventana de resultados: C, línea control; T, línea de prueba con Ac anti Ag específico (pan)



Tipo C: TDR para paludismo por las principales especies de *Plasmodium* (pan) y *P. falciparum*

Ventana de resultados: C, línea control; T1, línea de prueba con Ac anti pLDH (pan) o anti aldolasa; T2, línea de prueba con Ac anti HRP2 o pLDH específica de *P. falciparum*



Tipo D: TDR para paludismo por *P. falciparum* y las principales especies de *Plasmodium* (pan)

Ventana de resultados: C, línea control; T1, línea de prueba con Ac anti HRP2 o pLDH específica de *P. falciparum*; T2, línea de prueba con Ac anti pLDH (pan) o anti aldolasa



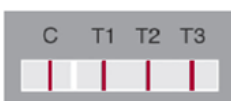
Tipo E: TDR para paludismo por *P. vivax* y *P. falciparum*

Ventana de resultados: C, línea control; T1, línea de prueba con Ac anti pLDH específica de *P. vivax*; T2, línea de prueba con Ac anti HRP2 o pLDH específica de *P. falciparum*



Tipo F: TDR para paludismo por *P. falciparum* y *P. vivax*

Ventana de resultados: C, línea control; T1, línea de prueba con Ac anti HRP2 o pLDH específica de *P. falciparum*; T2, línea de prueba con Ac anti pLDH específica de *P. vivax*



Tipo G: TDR para paludismo las principales especies de *Plasmodium* (pan), *P. vivax* y *P. falciparum*

Ventana de resultados: C, línea control; T1, línea de prueba con Ac anti pLDH (pan) o anti aldolasa; T2, línea de prueba con Ac anti pLDH específica de *P. vivax*; T3, línea de prueba con Ac anti HRP2 o pLDH específica de *P. falciparum*



Tipo H: TDR para paludismo por *P. vivax/P. malariae/P. ovale* y *P. falciparum*

Ventana de resultados: C, línea control; T1, línea de prueba con Ac anti pLDH de *P. vivax/P. malariae/P. ovale*; T2, línea de prueba con Ac anti HRP2 o pLDH específica de *P. falciparum*



Tipo I: TDR para paludismo por *P. vivax*

Ventana de resultados: C, línea control; T1, línea de prueba con Ac anti pLDH específica de *P. vivax*

Tipos de TDR, según líneas de control y prueba


CAPÍTULO 9: SELECCIÓN DE LOS TDR

9.1. ELECCIÓN DEL TDR

9.1.1. Factores a analizar

La selección de los TDR a ser utilizados en un laboratorio debe ser realizada tras el análisis de varios factores, como la especie predominante en la región, la disponibilidad de lugares adecuados para su almacenamiento, situaciones clínicas, usuario.

Parámetro	Proceso de decisión
1. Especies de plasmodios a detectar	<p>Distingue no-Pf de Pf o mixta?</p> <p>Si → Test combinado HRP2-pan LDH HRP2-pan aldolasa Pf pLDH-pan LDH</p> <p>No → Test sólo para Pf HRP2 pLDH (puede ser combinado con pLDH pan-especifica)</p>
2. Áreas donde será usado	<p>Almacenamiento y uso en ambiente tropical sin control de temperatura?</p> <p>Si → Test de alta estabilidad Temperatura especificada Ej. >35°C</p> <p>No → Temperatura de almacenamiento menos crítica Acepta <35°C de almacenamiento</p>
3. Posibles situaciones clínicas	<p>Uso para monitoreo de tratamiento?</p> <p>Si → Antígeno blanco no persistente Detección de pLDH para Pf</p> <p>No → Persistencia de antígeno no crítica HRP2 o pLDH para Pf</p>
4. Usuario final	<p>Trabajador de la salud en terreno?</p> <p>Si → Formato simple, todo incluido Cassette</p> <p>No → Diseño menos crítico Tiras reactivas solamente</p>
5. Otras consideraciones Tamaño de caja: Cuántos casos febriles en 3 meses?	
Elaborar lista reducida de RDT apropiados	

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 72 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

9.1.2. Criterios de selección

Otro factor muy importante a considerar cuando se desea adquirir estas pruebas es el porcentaje de sensibilidad que presentan.

Los criterios de selección son:

- Para la detección de *Plasmodium falciparum* (Pf) en todas las condiciones de transmisión, la puntuación del panel de detección el (PDS) contra muestras de Pf debe ser de al menos el 75% a 200 parásitos /ml.
- Para la detección de *Plasmodium vivax* (Pv) en todas las condiciones de transmisión, la puntuación del panel de detección el (PDS) contra muestras de Pv debe ser de al menos el 75% a 200 parásitos /ml.
- La tasa de falsos positivos debe ser inferior a 10%.
- La tasa de no válido debe ser inferior a 5%.

Para la elección final debería emplearse la guía interactiva (<http://www.rdt-interactive-guide.org/>) que presenta los datos de evaluación de los TDR, producidos por los principales fabricantes y distribuidores, emitidos por la OMS en rondas determinadas.

9.2. UTILIDAD EN ARGENTINA

Los TDR no tienen actualmente en Argentina aprobación de uso diagnóstico en ANMAT. Por tal motivo, su empleo estaría condicionado a su aprobación luego de la elección del test más conveniente según el algoritmo y los criterios antes descriptos.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Debería considerarse en la selección de los kits dos referencias geográficas:

- Puertos de entrada al país (aeropuertos y puertos marítimos) y destinos turísticos internacionales, seleccionando kits con alto score para la detección de infecciones para *P. falciparum* (incluyendo aquellas variantes que no expresan HRP II) o TDR de 3 líneas (Pf/Pf/Pv).
- Áreas argentinas ex-endémica y ex-epidémica, seleccionando kits con alto score para la detección de *P. vivax*, dependiendo de la cobertura con la red diagnóstica de microscopía y los tiempos entre la detección y el resultado para fortalecer el diagnóstico oportuno.

Su utilidad estaría dada en las siguientes situaciones:

- Brote de febriles: los TDR podrían representar un instrumento para la identificación rápida de la etiología palúdica de la fiebre y contención del brote.
- Zonas distantes de buenos servicios de microscopía.
- Guardias hospitalarias sin personal capacitado en microscopía.

SECCIÓN IV

TÉCNICAS MOLECULARES

COPIA NO CONTROLADA

CAPÍTULO 10: FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA DE PCR

10.1. LA REACCIÓN DE PCR

La PCR es una amplificación enzimática específica de ADN realizada *in vitro*, es decir, donde un segmento particular de ADN es copiado y específicamente amplificado. Es una forma simple y muy rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológicas, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de ADN. Las siglas PCR significan "**P**olimerase **C**hain **R**eaction", Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se fundamenta en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' - 3' usando un molde de cadena simple, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados cebadores (primers). Son un par de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.

Partiendo de este principio, la PCR se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas:

1ª **Desnaturalización** del ADN doble cadena

2ª **Hibridación** de los cebadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras

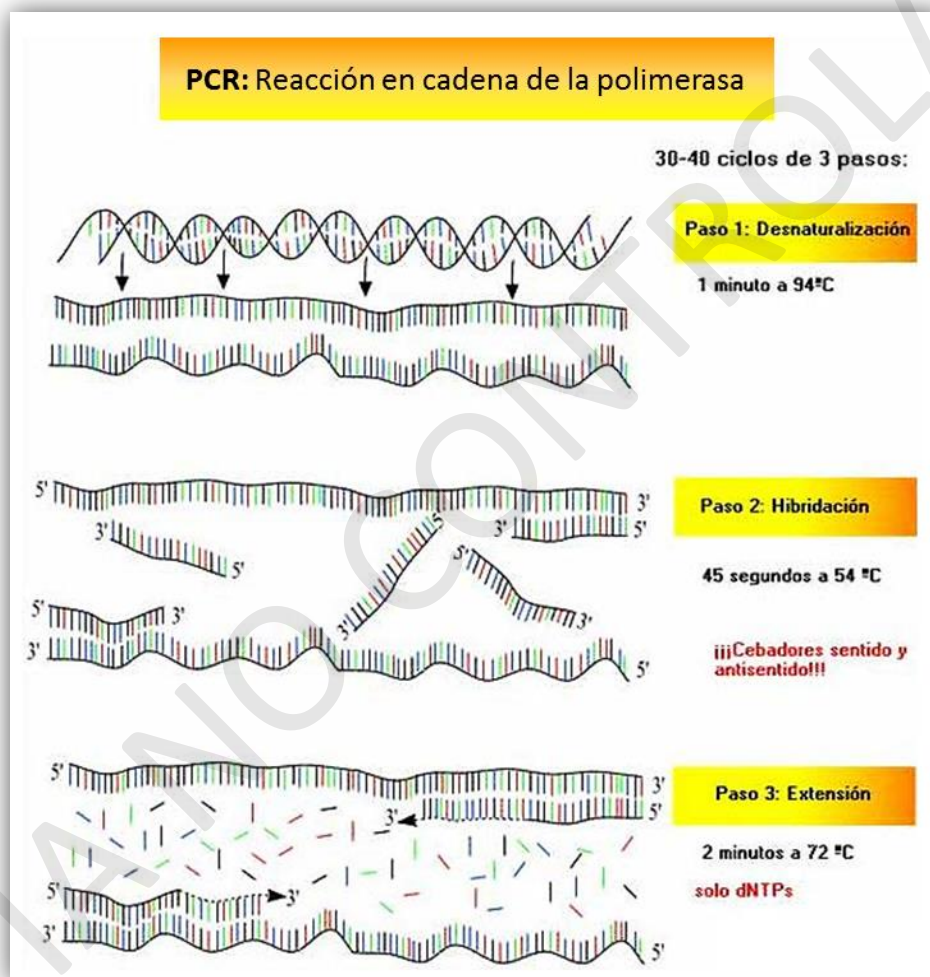
3ª **Extensión** del cebador por actuación de la DNA polimerasa

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que se quiere amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65°C).

Diagnóstico laboratorial de paludismo

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena simple (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'- 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los deoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) presentes en el medio siguiendo la cadena molde.



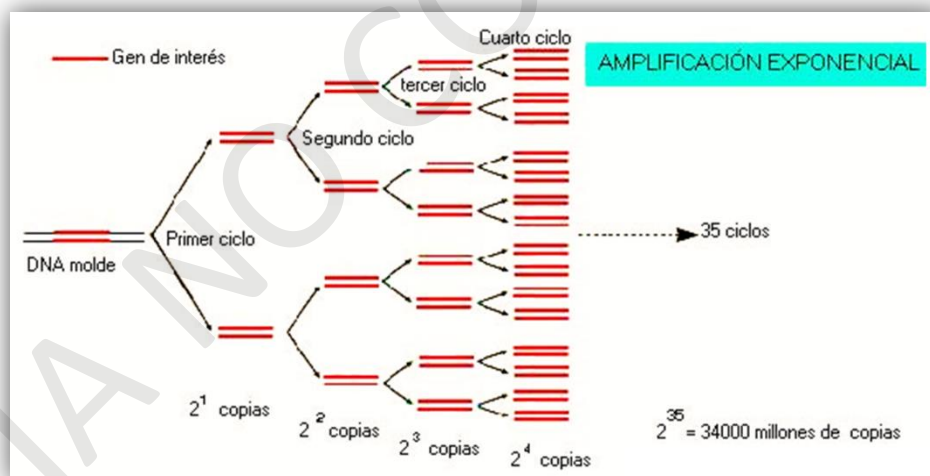
Pasos básicos de la PCR

El proceso se lleva a cabo en un termociclador, que corresponde a un aparato que realiza los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Una vez completado el primer ciclo, se obtienen 2 copias de la muestra original, al final del segundo ciclo 4, al final del tercero 8... Si los ciclos se producen un número "n" de veces y suponiendo que el número de copias de ADN se duplica en cada ciclo, se obtiene una cantidad de ADN de 2^n , por lo que la amplificación se realiza en forma de progresión geométrica.

Es importante recalcar que los productos obtenidos tras la tercera etapa son de dos tipos: "producto corto" y "producto largo". El producto corto tiene una longitud perfectamente definida por los extremos 5' de los cebadores y contiene exactamente la secuencia que se desea amplificar. Es el fragmento que se almacena de manera exponencial durante la reacción. El producto largo es el que incorpora las cadenas de ADN originales de la muestra y cuyos extremos 3' no están definidos. Sin embargo, es importante aclarar que al final de la PCR, la cantidad de producto corto sintetizado es muy superior en comparación con el producto largo, por lo que generalmente para posteriores estudios a partir del producto de la PCR, se desestima.



Amplificación exponencial de la PCR

La detección del producto de la PCR se realiza normalmente mediante electroforesis en geles de agarosa a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con mediante tinción y luz UV.

10.2. COMPONENTES Y OPTIMIZACIÓN DE LA PCR

10.2.1. Muestra de ADN

Existen una serie de reglas sencillas para que el DNA molde no sea un problema en la reacción:

- Integridad del ADN: no puede estar fragmentado en trozos más pequeños de lo que queremos amplificar.
- Origen de la muestra y proceso de extracción: la muestra no debe contener inhibidores de la actividad de la polimerasa.
- Cantidad de la muestra: El mínimo oscila entre 10-100 ng y el máximo entre 400-500 ng.

10.2.2. Diseño de los cebadores

Para la elección de los primers, existen una serie de normas que deben considerarse:

- El contenido en G+C debe ser aproximadamente del 50%. La relación máxima de purinas/pirimidinas será 60%/40%.
- Deben evitarse zonas con largas secuencias de una sola base.
- No seleccionar cebadores que en su extremo 3' tenga una importante estructura secundaria.
- Se recomienda que en los extremos las últimas bases sean G o C.
- Se debe evitar la complementariedad entre el par de primers. Si ésta existe entre los extremos 3' se aumenta la posibilidad de que se creen dímeros de cebadores.
- Normalmente deben tener un tamaño de 18-30 pb.
- La temperatura de hibridación de los cebadores ha de ser similar en ambos y será variable en función de la secuencia de los mismos. Generalmente oscila entre 45 y 65°C.

10.2.3. DNA Polimerasa

Actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq polimerasa, que es una enzima termoestable que carece de actividad 3' → 5' exonucleasa. Por ello hay que intentar conseguir las mejores condiciones para que la fidelidad aumente tales como:

- No usar un alto número de ciclos, ya que la tasa de error es proporcional al número de estos. Normalmente el número de ciclos utilizado es de 25-30.
- La concentración de los dNTPs debe ser igual para los 4 y debe ser la más baja posible para que nos permita conseguir la cantidad de ADN necesaria.
- Disminuir en lo posible el tiempo de cada etapa.
- La concentración de Mg⁺⁺ en la reacción oscila entre 0.50 y 2.5 mM. Se trata de un ión necesario, pero su exceso hace que disminuya la especificidad de la PCR.


10.2.4. Deoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs)

Son cuatro: dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y los 200 μM. Los dNTPs pueden captar Mg⁺⁺, por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación. No debemos variar ninguno de ellos de manera independiente. Se aconseja que la concentración de Mg⁺⁺ sea 0.5-1 veces superior a la concentración de dNTPs.

10.2.5. Buffer de la reacción

Por lo general está formado por: 10 mM tris-HCl (pH=8.4 a temperatura ambiente), 50 mM ClK, y 1.5 mM MgCl₂.

Algunos autores recomiendan el uso de adyuvantes, los cuales ayudarían en la práctica a aumentar la especificidad y fidelidad de la reacción en cadena de la polimerasa. El dimetilsulfóxido (DMSO) añadido al buffer de la reacción en un 10% contribuye a la disminución de la estructura secundaria del ADN. También se pueden usar detergentes como el Tween 20, Laureth 12 (0.1%) o Tritón X100, que ayudan a estabilizar la enzima. Existen también protocolos

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 80 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

que incorporan polietilenglicol (PEG), glicerol, formamida, seroalbúmina bovina (BSA), etc, aunque no son en ningún caso imprescindibles.

10.2.6. Sales

Es de gran importancia la concentración de dos cationes que son añadidos en forma de sales.

- **Cloruro potásico (KCl):** Influye en la desnaturalización del ADN. Elevadas concentraciones del ión K^+ favorece la desnaturalización de secuencias cortas de ADN. Bajas concentraciones de K^+ ayudan a la desnaturalización de secuencias largas de ADN.
- **Cloruro de magnesio ($MgCl_2$).** Aumenta la temperatura de hibridación del DNA. La concentración de este ion resulta fundamental para la optimización de la reacción. Altas concentraciones de Mg^{++} disminuyen la especificidad de la PCR. Bajas concentraciones de Mg^{++} aumentan la especificidad de la reacción.

10.2.7. Temperaturas y tiempos de los ciclos

La PCR se realiza en tres etapas que constituyen un ciclo, que repite durante un número determinado de veces. El tiempo, la temperatura y el número de ciclos son factores determinantes en los resultados de la PCR, por lo tanto modificándolos se puede optimizar la reacción.

A continuación se describe de forma más detallada el tiempo y la temperatura de cada una de las etapas de un ciclo.

1. **Desnaturalización**

Se trata de una etapa crítica ya que es muy importante que el ADN molde se desnaturalice completamente. Para lograrlo de manera adecuada se recomiendan temperaturas de $94^{\circ}C$ durante 30 segundos a 1 minuto. Si la muestra tiene alto contenido de G+C se puede aumentar el tiempo o la temperatura. Sin embargo hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima decrece de manera muy rápida a partir de los $95^{\circ}C$, por lo que a estas

temperaturas o superiores es aconsejable disminuir el tiempo de incubación. En la práctica se suele añadir un período de desnaturalización antes de comenzar los ciclos para asegurar que se produce a lo largo de toda la muestra de ADN. Esta etapa suele ser de 5 minutos a 94°C.

2. Hibridación

En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los oligonucleótidos: la composición de bases, el tamaño y la concentración. La temperatura de hibridación puede oscilar entre 45°C y 65°C, durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 1 minuto. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con la hebra molde.

3. Elongación

En la mayoría de las reacciones, la etapa de extensión se realiza a 72°C. Teóricamente esta temperatura puede variar entre 70-72°C. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación. Es normal que al final de todos los ciclos se realice una última elongación de 5 minutos a 72°C.

10.2.8. Número de ciclos

Este número depende de la cantidad de ADN que existe en la muestra una vez que el resto de factores han sido optimizados. Es importante no realizar un número alto de ciclos ya que puede dar lugar a la amplificación de productos no deseados originados por hibridaciones no específicas.

Hay que tener en cuenta que la reacción está producida por una enzima que sufre el efecto meseta que describe la atenuación en la tasa de la acumulación del producto. Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja producirse de manera exponencial y llega a una fase estacionaria. Generalmente cuando el efecto meseta se produce, la cantidad de ADN sintetizado es suficiente para su posterior utilización.

10.3. CONTAMINACIÓN EN LA PCR

La PCR es una técnica rápida y versátil, convirtiéndose hasta la fecha en una técnica comúnmente utilizada en diversos laboratorios. Tiene ventajas tales como requerir una cantidad mínima de templado en la reacción, el cual no necesariamente debe estar puro, permitiendo una fácil y rápida obtención de resultados. Sin embargo, la experiencia ha permitido establecer una gran limitante, como es la alta susceptibilidad de contaminación en alguna de las etapas de la técnica: la extracción del templado, la preparación de reactivos, la dispensación o carga del templado y la etapa de electroforesis.

Para minimizar este problema existen ciertas condiciones que deben ser controladas, tales como: separar áreas de trabajo contaminadas con templado de aquellas áreas libres de él con sets independientes de equipamiento que no se deben compartir entre áreas (micropipetas, gradillas, guardapolvos, guantes, refrigerantes, toalla absorbente, alcohol, marcadores, microtubos, minicentrífugas, heladeras, etc) y mantener un flujo unidireccional de trabajo desde las áreas más limpias hacia las más sucias.

La PCR es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y se obtenga un resultado que no es real.

La contaminación de las reacciones de PCR es un problema constante para los laboratorios que realizan este procedimiento. Sin embargo, hay una serie de medidas para controlar esta contaminación, y el grado de rigor que se requiere en un laboratorio a menudo se determina según el ensayo que se va a realizar.

Las fuentes más comunes de contaminación corresponden a templados y amplicones. Pueden provenir de las muestras biológicas que se manipulan durante la etapa de extracción y/o la etapa de carga o dispensación durante la preparación de la reacción de PCR, y de los amplicones manipulados en el área de post-PCR, principalmente. Ellas pueden ser muy problemáticas debido a su gran estabilidad, contaminando: equipos, superficies, micropipetas, microtubos, soluciones, guantes, delantales, gradillas, refrigerantes y marcadores.

Las vías de contaminación principales son los aerosoles y el derrame de soluciones. En el primer caso la formación de estas microgotas con ácido nucleico puede originarse por la apertura de tubos que contengan templado y amplicones y son de fácil dispersión. En cuanto a la segunda vía, el contacto de soluciones que contengan ácidos nucleicos con la superficie de trabajo es una vía común de contaminación, la cual puede ocurrir ya sea por volcamiento de microtubos (y el consecuente derrame de la solución) o por la disposición de tapas de microtubos sobre la superficie, tips de micropipeta ya utilizados, etc. que dejan residuos contaminantes.

Para disminuir los riesgos de contaminación en la PCR, debe realizarse un cuidadoso estudio de la ubicación de las diferentes áreas del proceso. A su vez, es fundamental el uso exclusivo de equipamiento, guantes y material de laboratorio en cada área.

10.3.1. Recomendaciones para disminuir la contaminación

- No deben almacenarse en un mismo refrigerador/ congelador, reactivos libres de templado junto con ácidos nucleicos purificados y/o con muestras biológicas.
- Si se detecta contaminación en algún reactivo, primer, agua, enzima, etc, éste debe ser eliminado. Para evitar pérdidas de los stocks de reactivos por contaminación, se recomienda preparar alícuotas previo a su uso, de manera de sólo eliminar la alícuota en uso si se detecta contaminación.
- Centrifugar brevemente (spin) los tubos que contengan ácidos nucleicos y luego abrirlos cuidadosamente para evitar contaminar los guantes y las superficies.
- La superficie utilizada para preparar las reacciones de PCR debe ser descontaminada con radiación ultravioleta antes y después de la preparación (15 a 30 minutos). Si se sospecha contaminación, adicionalmente, una vez terminado el trabajo, pueden limpiarse las superficies con una solución de 0,5- 1,0 % de hipoclorito de sodio, que luego debe ser removido con etanol 70%. También es posible utilizar soluciones comerciales para este fin.
- Es recomendable incorporar siguientes controles negativos, para tener un mejor manejo de las contaminaciones.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Cada vez que un operador ingrese a un área diferente debe ponerse guantes y guardapolvo nuevos, y utilizar sólo los equipos y materiales disponibles en esa área. Es altamente recomendable el uso de delantales desechables.

10.3.2. Flujo de trabajo

Debe seguirse un flujo de trabajo unidireccional al realizar las actividades propias de un laboratorio de PCR, de manera de trabajar siempre desde el área más limpia hacia las áreas más sucias: Preparación de reactivos, Carga o dispensación del templado, Amplificación y Detección.


Área de extracción y purificación de templado

En este espacio deben realizarse las extracciones y/o purificaciones de ácidos nucleicos que luego serán utilizados como templado para las reacciones de PCR. El almacenamiento de este material debe realizarse en un congelador exclusivo ubicado dentro de este espacio. La extracción debe realizarse en un gabinete de bioseguridad clase II, de forma que el personal que manipule muestras biológicas se mantenga protegido y, al mismo tiempo, se aisle el templado de posibles contaminaciones externas.

Área limpia de preparación de reactivos

El área de preparación de reactivos se define como aquella área limpia donde se utilizan protocolos y equipamientos para preparar las mezclas de reacción que serán utilizadas en la PCR. Todo equipamiento de esta área es exclusivo y no se puede utilizar en otra área del laboratorio. En este lugar debe haber un congelador de -20°C de uso exclusivo para almacenar los reactivos utilizados para preparar reacciones de PCR, y nunca mezclarlos con cualquier tipo de material biológico. Los stocks de primers y los reactivos de PCR nuevos deben almacenarse en una ubicación diferente, dentro del mismo congelador, con respecto a los reactivos de uso diario, para evitar su posible contaminación.

Los guardapolvos y guantes utilizados en esta área deben ser exclusivos, ya que no debe existir contaminación desde otras áreas. Por lo tanto, el personal que ingrese a esta sala debe

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
Diagnóstico laboratorial de paludismo		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 85 de 210

sacarse previamente los elementos de protección que esté utilizando, y vestir elementos de protección limpios una vez dentro de esta área.

Este espacio debe contar con una cabina de PCR cerrada que posea luz ultravioleta. Dentro de esta cabina deben manipularse todos los reactivos para preparar mezclas de PCR. En su interior deben mantenerse la micropipetas, tubos y gradillas de uso diario.

Área de carga o dispensación de templado

En esta área deben dispensarse los templados a las mezclas de PCR que han sido preparadas en el área limpia. El personal debe ingresar y utilizar los elementos de protección exclusivos de esta área. Antes de abrir los tubos que contienen el ADN templado, debe realizarse una breve centrifugación para evitar el escape de aerosoles al abrir el tubo. Una vez adicionado el ácido nucleico templado, cerrar herméticamente los tubos y llevar al área de amplificación.

Área de amplificación y detección

Antes de entrar a esta área sucia, el personal debe vestir guantes y delantal exclusivos de este sector. Al finalizar la reacción en el termociclador, los amplicones son manipulados en el sector de electroforesis para la verificación de resultados, el cual debe contar con cámaras de electroforesis, fuentes de poder y los materiales requeridos para su funcionamiento y documentación.

10.4. VARIACIONES DE LA PCR

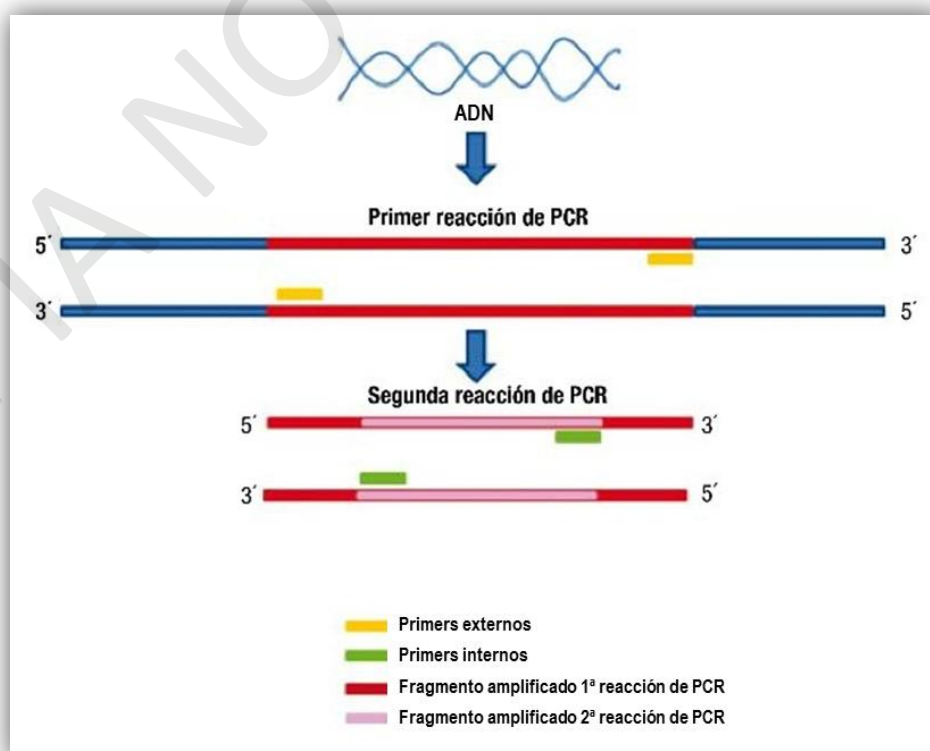
Han surgido numerosas modificaciones derivadas del método básico inicial, con el propósito de mejorar el rendimiento o la especificidad, adaptarse a muestras particulares, amplificar moléculas de ARN en lugar de ADN, producir cadenas de hebra sencilla.

Las variantes más comunes son: PCR anidada, PCR larga, PCR *in situ*, PCR inversa, PCR con adaptadores, PCR asimétrica, PCR múltiple, RT-PCR, PCR en tiempo real.

A continuación se detallan las variantes de la PCR que serán descriptas para su empleo en paludismo.

10.4.1. PCR anidada

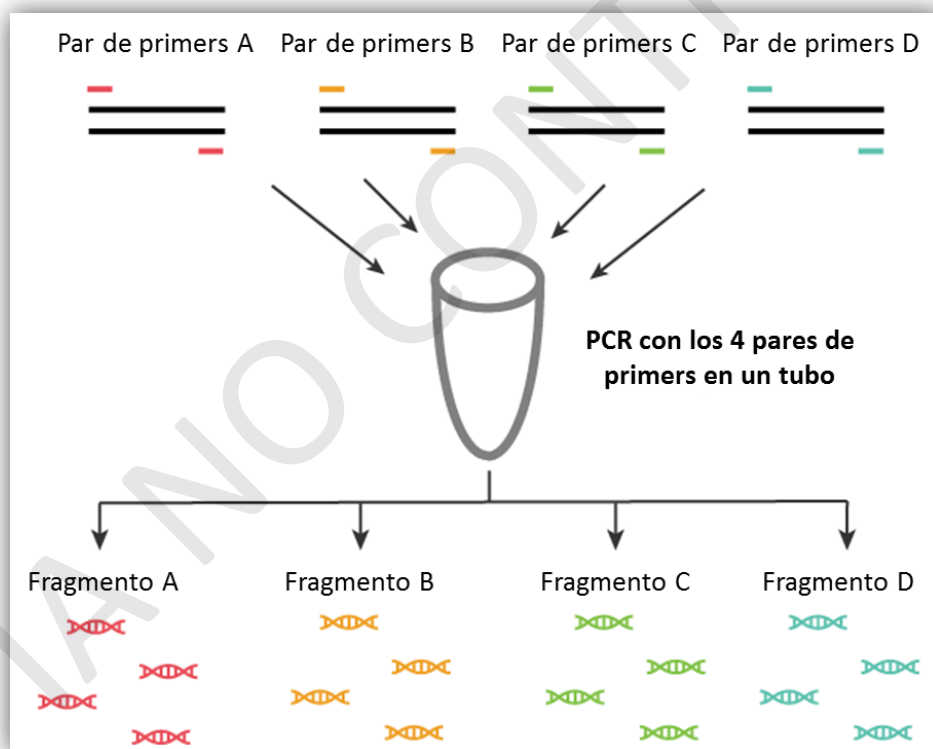
Es una técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, es decir, cuando tenemos el primer amplicón se pueden unir los cebadores y se hace de nuevo una amplificación dentro del amplicón inicial. Este tipo de PCR tiene la ventaja de brindar alta sensibilidad y especificidad. La especificidad aumenta porque como es amplificación de un amplicón obtenido previamente, los cebadores sólo van a hibridar en un sitio dentro de la molécula y el resultado será una única banda. Así, se evitan posibles hibridaciones inespecíficas de los cebadores.



PCR anidada

10.4.2. PCR multiplex

Es una PCR en la cual se amplifica simultáneamente más de una secuencia. Para ello, se combinan dos o más pares de cebadores en un mismo tubo, junto con el resto de los reactivos de la reacción en cantidades suficientes, para amplificar simultáneamente varios segmentos de ADN. Tiene como ventajas información sobre varios locus en una sola reacción, menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, rápida construcción de bases de datos. Entre sus desventajas está que para llevarla a cabo adecuadamente y sin errores, se requiere de una cuidadosa optimización del proceso.



PCR multiplex

10.4.3. PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR)

En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de

ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

La PCR en tiempo real también permite identificar con una muy alta probabilidad, muestras de ADN específicas a partir de su temperatura de fusión (también denominado valor T_m , del inglés melting temperature).

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas.

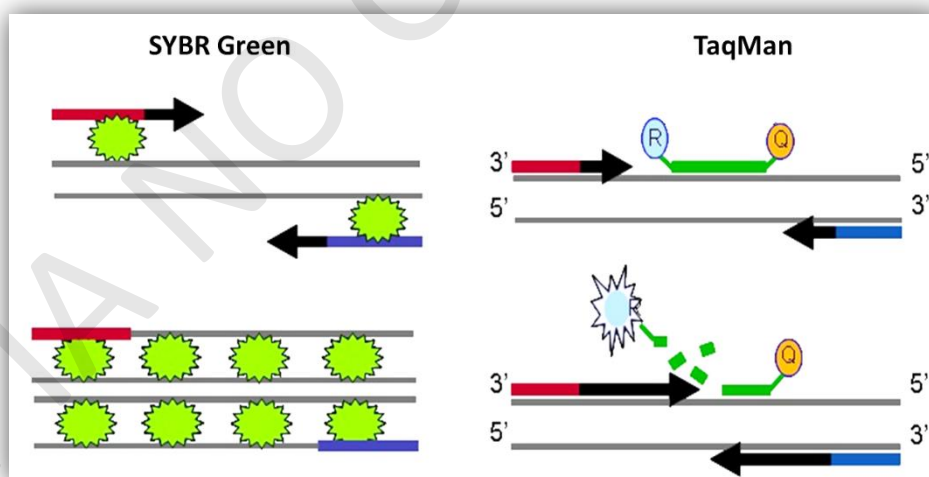
Agentes intercalantes

Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia blanco.

Sondas de hibridación específicas

Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Todas se basan en el principio FRET (Flouescence Resonance Energy Transfer por sus siglas en inglés), que consiste en la transferencia de energía entre dos fluoróforos: un donador (reportero) y un aceptor (apagador o quencher), los cuales emiten fluorescencia a diferente longitud de onda. Cuando el reportero y el quencher se encuentran próximos, el quencher absorbe toda la fluorescencia del reportero. Cuando este par de moléculas se separa, la fluorescencia del reportero no puede ser absorbida por el apagador y en consecuencia puede ser detectada por el fotodetector. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

Entre estas sondas se encuentran las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan (siendo éstas las más utilizadas), Molecular Beacons, sondas FRET y primers o sondas Scorpion.



PCR en tiempo real

CAPÍTULO 11: IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES

11.1. APLICACIONES DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES

Todas las técnicas de amplificación del ácido nucleico en paludismo están recomendadas para realización de estudios específicos pero no para el manejo de los casos y la vigilancia rutinaria.

Existen varias técnicas de amplificación del ácido nucleico disponibles, que son más sensibles para detectar el paludismo que los TDR y la microscopía. En general, el uso de herramientas de diagnóstico altamente sensibles debe considerarse solo en entornos de baja transmisión en los que ya existe un diagnóstico y tratamiento de malaria ampliamente difundido y bajas tasas de prevalencia de parásitos (por ejemplo, <10%). Las infecciones submicroscópicas de *P. falciparum* y *P. vivax* son comunes tanto en entornos de transmisión baja como alta. El uso de métodos de amplificación del ácido nucleico debe considerarse para la investigación epidemiológica y las encuestas para mapear infecciones submicroscópicas en áreas de baja transmisión. Los métodos moleculares también pueden usarse para identificar focos para intervenciones especiales en entornos de eliminación.

Las técnicas basadas en PCR consisten en la detección de ADN de *Plasmodium* amplificado a niveles detectables a partir de cantidades pequeñas presentes en muestras de sangre total anticoagulada, muestra de sangre en papel filtro o láminas coloreadas.

La PCR ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad que el examen microscópico convencional. La PCR puede detectar tan solo 1-5 parásitos/ μ l de sangre ($\leq 0.0001\%$ de los glóbulos rojos infectados) en comparación con alrededor de 10-100 parásitos/ μ l de sangre por microscopía o TDR.

Algunas modificaciones de la PCR están demostrando ser confiables, por ejemplo, PCR anidada y PCR en tiempo real, y parecen ser técnicas de segunda línea útiles cuando los resultados de los métodos de diagnóstico tradicionales no son concluyentes en pacientes con signos y síntomas de paludismo; también permiten la determinación exacta de especies. Recientemente, la PCR ha sido ampliamente aceptada para la identificación de infecciones por *P. knowlesi*.

Aunque la PCR parece haber superado los dos problemas principales de sensibilidad y especificidad del diagnóstico del paludismo, la utilidad de la PCR está limitada por metodologías complejas, alto costo y la necesidad de técnicos especialmente capacitados. La PCR, por lo tanto, no se implementa de manera rutinaria en los países en desarrollo debido a la complejidad de las pruebas y la falta de recursos para realizar estas pruebas de manera adecuada y rutinaria. El control de calidad y el mantenimiento de los equipos también son esenciales para la técnica de PCR, por lo que puede no ser adecuada en áreas rurales remotas o en la rutina. Estas técnicas pueden ser utilizadas en laboratorios de referencia y laboratorios de investigación debido a sus requerimientos técnicos.

En Argentina la aplicación de las técnicas moleculares está a cargo del Laboratorio Nacional de Referencia y podrán ser transferidas a los Laboratorios Jurisdiccionales.

Se emplean con fines de investigación y/o identificación de especie en aquellos casos en los cuales la microscopía óptica arroja resultados no conclusivos, quedando a criterio del Laboratorio Nacional de Referencia su aplicación.

Se utilizan los siguientes protocolos de amplificación:

- PCR para diagnóstico de *Plasmodium vivax* basada en detección de secuencias repetitivas (Carnevale y col., 2004).
- PCR anidada para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* (Snounou y col., 1993, modificada por Johnston y col., 2006), ante sospecha de infecciones mixtas.
- PCR en tiempo real basada en ARN ribosomal 18S con sondas TaqMan, para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* (Rougemont y col., 2004), para identificación a nivel de especie.
- PCR anidada para *P. knowlesi* (Singh y col., 2004).

11.2. BIOSEGURIDAD EN BIOLOGÍA MOLECULAR

El laboratorio de biología molecular tiene una serie de condiciones especiales relacionadas con el manejo de reactivos, elementos y equipos que pueden influir en la salud del personal así como repercutir en el medio ambiente. Es importante conocer las normas establecidas, familiarizarse con el uso de cada uno de los materiales de trabajo para evitar cometer errores o sufrir accidentes durante su manipulación.

El personal del laboratorio está expuesto a una serie de riesgos ocupacionales por agentes físicos, químicos y biológicos, los cuales pueden originar alteraciones en la salud, generalmente prevenibles si se aplican las normas de bioseguridad, que incluyen el manejo correcto de material infeccioso, así como el uso de elementos protectores, y el manejo adecuado de desechos biológicos y reactivos químicos.

11.2.1. Clasificación general de factores y agentes de riesgo

Físicos: Este tipo de riesgo está determinado por una variedad de agentes:

- Mecánico: objeto en movimiento.
- Térmico: altas o bajas temperaturas.
- Eléctrico: alto voltaje y conexiones eléctricas.
- Radiaciones: ionizantes y radioactivas.
- Incendios.
- Iluminación.
- Ruidos o vibraciones: por funcionamiento de equipos.
- Microclima: condiciones de temperatura de instalación.
- Presiones anormales.

Químicos: Al manipular reactivos químicos, es necesario conocer y evaluar sus peligros y determinar la forma apropiada para su manejo seguro. Esta información se obtiene de las

Diagnóstico laboratorial de paludismo

etiquetas, hojas de seguridad suministradas por el fabricante u otras fuentes. Las etiquetas del fabricante incluyen el nombre del producto, el pictograma de seguridad, las frases de riesgo entre otras. Las hojas de seguridad informan sobre las propiedades físicas, químicas y toxicológicas de una sustancia y los procedimientos recomendados para una manipulación segura, uso de equipos para protección, primeros auxilios, tratamiento de desechos, derrames y otros. La clasificación de las sustancias químicas depende de su peligrosidad, de lo cual se establece que existen:

- Tóxicas
- Muy tóxicas
- Corrosivas
- Irritantes
- Inflamables
- Extremadamente inflamables
- Comburentes (en contacto con otras producen reacción exotérmica)
- Explosivas
- Nocivas
- Peligrosas para el medio ambiente
- Gaseosos (gases, vapores, aerosoles), sólidos (polvos orgánicos o inorgánicos, humos metálicos), líquidos (rocío, neblinas), compuestos (hidrocarburos).

Biológicos: Los riesgos biológicos se pueden identificar según: el tipo de material biológico que se manipula, los procedimientos de rutina realizados en el laboratorio, el manejo de desechos biológicos, el aseo y desinfección de las áreas de trabajo, la disponibilidad de implementos de protección personal, los protocolos de reconocimiento, las enfermedades relacionadas con el trabajo, los accidentes e incidentes más comunes como pinchazos, cortaduras e inhalaciones, las enfermedades ocupacionales adquiridas en el laboratorio.

Agentes potenciales de lesiones y accidentes: El trabajo en un laboratorio de biología molecular se lleva a cabo en condiciones especiales que pueden influir en la salud del personal y

tener repercusiones negativas para el medio ambiente. La principal característica lo constituye la labor intensiva del factor biológico, específicamente cuando se trabaja con microorganismos, su metabolismo y los tipos reactivos, materiales y equipos comúnmente empleados. Durante la manipulación se puede generar la producción de aerosoles infectivos que contaminen el ambiente laboral o los ensayos que se estén desarrollando.

11.2.2. Normas de precaución

Existen algunas normas de precaución universal que son necesarias tenerlas presentes en el manejo del laboratorio:

- Utilizar siempre elementos de barrera adecuados según las necesidades: blusa, guantes, mecheros, tapabocas, mascarillas, cámaras de seguridad, gafas, etc. para evitar contacto de mucosas y piel con aerosoles, gotas y salpicaduras.
- El lavado de manos es una de las estrategias más sencillas pero de suma importancia; este se debe hacer minuciosa y vigorosamente antes y después de tener contacto con sustancias o algún tipo de muestras. En caso de contacto directo con la piel o los ojos deben enjuagarse inmediatamente con abundante agua.
- Mujeres en estado de embarazo deben conocer y aplicar estrictamente las normas de bioseguridad.

En un laboratorio de biología molecular las precauciones adicionales que se deben adoptar son:

- Conocer las características de toxicidad de los reactivos y manejarlos de acuerdo a recomendaciones de los insertos y/o la ficha técnica respectiva.
- Conocer la distribución de las diferentes secciones del laboratorio, para evitar posibles riesgos de contaminación de las muestras que produzcan alteraciones en los resultados finales.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Utilizar siempre implementos de protección limpios (guantes, máscara, barbijo, guardapolvo)
- Lavarse las manos antes y después de trabajar en el laboratorio
- No tocar con las manos enguantadas ojos, nariz u otras mucosas expuestas.
- Desinfectar el área de trabajo antes y después de cada trabajo utilizando lavandina al 10% por 15 minutos.
- No pipetear ningún reactivo o solución acuosa con la boca.
- Los reactivos después de su uso, deben quedar perfectamente cerrados.
- Los materiales de desecho deben descartarse de acuerdo a su naturaleza: inactivados o tratados en las bolsas de basura del color adecuado y recipientes dispuestos para tal fin.

Se tendrán en cuenta las condiciones de bioseguridad descriptas en los Manual de Bioseguridad del CDC y OMS (Bioseguridad en laboratorios de microbiología y biomedicina CDC; y Bioseguridad en los laboratorios Organización Mundial de la Salud-3º ed).

11.2.3. Términos a considerar

Carcinógeno: agente que se sabe o sospecha causa cáncer.

Mutágeno: Agente que induce mutaciones en el material genético.

Teratógeno: agente que se sabe o sospecha que ocasiona daño al feto.

Tóxico: Sustancia que ocasiona daño a la salud, por exposición corta o prolongada, cuando es ingerida, inhalada o absorbida por la piel o mucosas.

Corrosivo: agente químico que destruye el tejido o los materiales por contacto directo.

CAPÍTULO 12: TOMA DE MUESTRAS PARA PCR

12.1. TOMA DE MUESTRAS EN PAPEL DE FILTRO

12.1.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para la toma de muestras de sangre en papel de filtro para el diagnóstico molecular de paludismo.

12.1.2. Introducción

La técnica de PCR es más sensible para el diagnóstico de la malaria que la microscopía, particularmente para infecciones mixtas y baja parasitemia. Algunas muestras en el laboratorio podrían analizarse por PCR para confirmar especies e infecciones mixtas.

La toma de muestra por punción digital sobre soporte de papel de filtro le adiciona la ventaja de utilidad para estudios de campo debido a la simplicidad de recolección, transporte, mantenimiento y procesamiento.

Las muestras de sangre recolectadas en papel de filtro también podrían ser usadas para la genotipificación de cepas de parásitos para distinguir infecciones debido a la transmisión local de casos importados en entornos de eliminación del paludismo.

12.1.3. Materiales

- Tarjeta de papel de filtro Whatman #1 (según medidas)
- Bolsas de plástico de cierre hermético, una para cada paciente
- Desecante con sílica gel
- Lancetas estériles

Diagnóstico laboratorial de paludismo

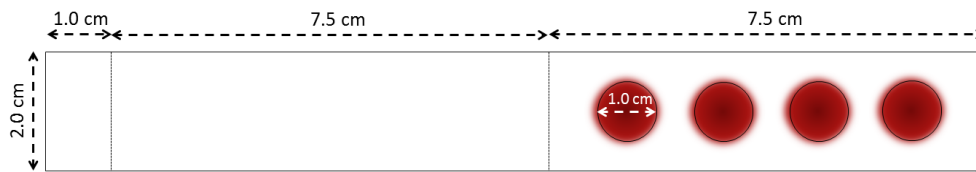
- Alcohol
- Algodón
- Heladera a 4°C o freezer a -20°C o freezer a -80°C
- Guantes
- Descartador de elementos cortopunzantes
- Lapicera

12.1.4. Procedimiento

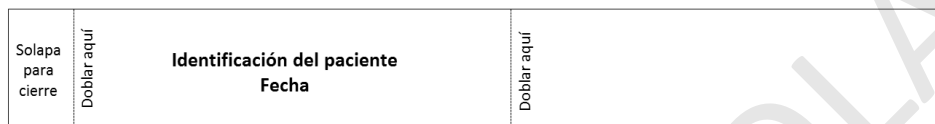
Durante la toma de muestras el operador deberá utilizar guantes. Para la obtención de la muestra se realizará el siguiente protocolo:

1. Rotular la tarjeta de papel de filtro con el nombre o número de paciente y la fecha.
2. Sostener la mano izquierda del paciente con la palma hacia arriba y seleccionar el dedo anular.
3. Limpiar firmemente el dedo con algodón embebido en alcohol, para remover suciedad o grasitud de la yema del dedo.
4. Secar con un algodón limpio fuertemente para estimular la circulación sanguínea.
5. Punzar la cara lateral del dedo con una lanceta estéril.
6. Aplicar una presión suave para que salga la primera gota, descartarla en un algodón y asegurarse que no quede resto de algodón en el dedo.
7. Colectar la sangre rápidamente sobre las 4 posiciones de la tarjeta, aplicando presión sobre el dedo.
8. Utilizar el patrón para la preparación de la tarjeta

Diagnóstico laboratorial de paludismo



Vista interna



Vista externa

Patrón a utilizar para la preparación de las tarjetas

9. Limpiar la sangre remanente en el dedo con un algodón
10. Permitir el secado sobre una superficie plana, protegido de insectos, polvo y calor extremo.
11. Colocar en bolsa con cierre el hermético y guardar.

12.1.5. Comentarios

- Almacene las muestras en un refrigerador a 4°C cuando no se procesen inmediatamente después de la recolección, pero dentro de un período de 4 semanas.
- Almacene las muestras en un congelador a -20°C para procesar dentro de los 3 meses.
- Almacene las muestras en un congelador a -80°C cuando para procesar después de 1 año.

12.2. TOMA DE MUESTRAS POR VENOPUNCTURA

12.2.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para la toma de muestras de sangre por punción venosa para el diagnóstico molecular de paludismo.

12.2.2. Introducción

En algunos establecimientos de salud, se toman muestras de sangre venosa para múltiples análisis. Se recogen volúmenes más grandes que por punción digital, y se almacenan en tubos que contienen anticoagulante (preferiblemente EDTA). Las muestras de sangre venosa tratadas con anticoagulantes pueden usarse para diagnóstico molecular de paludismo y para su empleo en TDR.

12.2.3. Materiales

- Jeringa de 10 ml
- Aguja 21G x 38 mm
- Lazo
- Algodón
- Parche tipo curita
- Tubo plástico de 15 ml con tapa a rosca
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Gradilla para tubos de centrifuga
- Gradilla para tubos de microcentrífuga
- Planilla de registro

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Bolígrafo.
- Marcador indeleble
- Guantes
- Descartador de elementos corto-punzantes
- Alcohol 96°
- EDTA 0.125 M. Agregar 100 µl al tubo de 15 ml tapa a rosca

12.2.4. Procedimiento

1. Solicitar al paciente que descubra su brazo por sobre el codo.
2. Colocar el antebrazo del paciente sobre una superficie plana con la palma hacia arriba.
3. Ligar en el brazo a puncionar con el lazo a 4-5 cm por sobre el pliegue del codo. Pasar el lazo por detrás quedando con ambos extremos por delante, luego cruzar por delante y pasar uno de los extremos por dentro pero hasta la mitad, dejando un extremo libre.
4. Localizar la vena a puncionar por palpación y valorizar su calibre.
5. Limpiar el sitio de punción en un sentido, hacia arriba siguiendo el sentido del retorno venoso.
6. Colocarse guantes de látex.
7. Abrir el envase donde se encuentra la jeringa.
8. Aplicar alcohol en la zona de punción.
9. Conectar la aguja a la jeringa.
10. Traccionar suavemente la piel.
11. Verificar que el bisel de la aguja este hacia arriba.
12. Introducir la aguja en la piel en un ángulo no superior a 45°.
13. Una vez puncionada la vena, aspirar suavemente. No movilizar la aguja ni pegarse a las paredes de la vena. Aspirar lentamente sin movilizar la aguja de su sitio.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

14. Tomar 10 ml de sangre.
15. Deslizar el lazo tirando del extremo libre.
16. Retirar la aguja en forma paralela.
17. Presionar la zona de punción con tórula de algodón seca. El tiempo de presión debe ser mínimo de 1 minuto, para evitar hematoma postpunción o sangrado.
18. Con mucho cuidado llenar el tubo conteniendo el anticoagulante.
19. Una vez terminado de llenar el tubo, desechar aguja en recipiente de cortopunzantes.
20. Colocar al paciente parche curita en el sitio de punción, observando que no exista salida de sangre.
21. Tapar el tubo con sangre y mezclar por inversión.
22. Fraccionar la muestra en tubos de microcentrífuga en alícuotas de 300 µl por tubo.
23. Mantener la muestra a -20°C hasta su procesamiento.

12.2.5. Comentarios

- Deberán ser remitidos al laboratorio al menos 5 alícuotas de 300 µl.
- Las muestras sanguíneas para métodos moleculares deben ser procesadas lo más pronto posible, ya que períodos prolongados de almacenamiento pueden degradar el ADN.

CAPÍTULO 13: EXTRACCIÓN DE ADN

13.1. EXTRACCIÓN A PARTIR DE MUESTRAS EN PAPEL DE FILTRO

13.1.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre en papel de filtro para el diagnóstico molecular de paludismo.

13.1.2. Introducción

Las muestras de sangre recolectadas en papel de filtro pueden ser fácilmente procesadas para aislamiento de ADN mediante elución, lisis y precipitación o empleando kits comerciales, eliminando las desventajas de volúmenes grandes de sangre.

13.1.3. Materiales

Equipos:

- Pipetas automáticas de volumen variable
- Microcentrífuga
- Baño termostático
- Freezer -20°C
- Heladera 4°C
- Agitador magnético
- pHmetro

Materiales descartables:

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Tips de 1000 μ l
- Tips de 10 μ l
- Guantes

Reactivos

- Solución stock de Proteinasa K
- Buffer de lisis para Paludismo
- Etanol 70%
- Agua bidestilada estéril
- Tris
- Dodecil sulfato de sodio (SDS)
- Cloruro de sodio
- EDTA
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio (en perlas)

13.1.4. Preparación de soluciones

Solución de Proteinasa K

Proteinasa K	20 mg
Agua bidestilada estéril	1 ml

Disolver y conservar en alícuotas de 20 μ l a -20°C .

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Buffer de lisis para paludismo

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	10 mM
SDS	1 %
NaCl	10 mM

Conservar a 4°C. En el momento de usar agregar al volumen necesario de buffer, solución stock de Proteinasa K para alcanzar una concentración final de 200 µg/ml.

Tris-HCL 1 M pH 8

Tris	121.1 g
Agua bidestilada	800.0 ml

Ajustar a pH 8 agregando aproximadamente 42 ml de HCl concentrado. Ajustar a volumen final de 1000 ml con agua. Autoclavar.

Esta solución stock deberá ser diluída con agua bidestilada estéril para alcanzar las molaridades requeridas en cada caso.

Cloruro de sodio 5 M

Cloruro de sodio	292.2 g
Agua bidestilada	1000.0 ml

Alicuotar y autoclavar.

Utilizar como solución stock para alcanzar las molaridades requeridas.

EDTA 0.5 M, pH 8

EDTA-Na ₂ .2 H ₂ O	186.1 g
Agua bidestilada	800.0 ml

Agitar en agitador magnético. Llevar a pH 8 con NaOH (aproximadamente 20 g de perlas).

Alicuotar y autoclavar.

Utilizar como solución stock para alcanzar las molaridades requeridas.

Etanol 70%

Etanol absoluto	70 ml
Agua bidestilada estéril	30 ml

13.1.5. Procedimiento

1. Recortar los círculos de 1 cm de diámetro de sangre.
2. Colocar 1 círculo por tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
3. Agregar 1 ml de buffer de lisis.
4. Incubar 1 hora a 56°C en baño termostático.
5. Transferir el sobrenadante a tubo limpio y descartar el filtro.
6. Agregar 800 µl de isopropanol.
7. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar durante 30 minutos a 14000 rpm. Marcar la posición del tubo que se ubica hacia el exterior de la microcentrífuga para identificar la posición del pellet.
9. Usando una micropipeta, descartar el líquido por el lado opuesto a la posición del pellet.
10. Agregar 500 µl de etanol 70%.
11. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.
12. Descartar el etanol.
13. Drenar sobre papel de filtro y evaporar.
14. Disolver el pellet en 10 µl de agua bidestilada estéril.
15. Conservar a -20°C o -70°C.

13.1.6. Utilización de kit comercial

Podrá emplearse el kit comercial **QIAamp® DNA Mini Blood Kit**. Se llevarán a cabo los procedimientos de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Antes de comenzar

- Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a temperatura ambiente (15-25 ° C).
- Preparar un baño de agua a 85°C, un baño de agua a 56°C, y un baño de agua a 70°C.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Equilibrar el buffer AE a temperatura ambiente (15-25°C).
- Asegurarse de que los buffer AW1 y buffer AW2 correctamente.
- Si se hubiera formado un precipitado en el buffer AL o en el buffer ATL, disolver incubándolo a 56°C.

Procedimiento

1. Colocar un círculo de sangre seca cortado en 4 partes en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y agregar 180 µl de tampón ATL.
2. Incubar a 85°C durante 10 minutos. Centrifugar brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa.
3. Agregar 20 µl de solución madre de proteinasa K. Vortexear e incubar a 56°C durante 1 hora. Centrifugar brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa.
4. Agregar 200 µl de buffer AL a la muestra. Vortexear e incubar a 70°C durante 10 minutos. Centrifugar brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa.
5. Agregar 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar bien agitando en vórtex. Centrifugar brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa.
6. Aplicar cuidadosamente la mezcla del paso 5 a la columna QIAamp Mini spin (en un tubo de recolección de 2 ml) sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugue a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar la columna QIAamp Mini en un tubo limpio de 2 ml, y desechar el tubo que contiene el filtrado.
7. Abrir con cuidado la columna y agregar 500 µl de buffer AW1 sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar la columna en un tubo de recolección limpio de 2 y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
8. Abrir con cuidado la columna y agregar 500 µl de buffer AW2 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima (20000 x g; 14000 rpm) durante 3 minutos.
9. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y desechar el tubo de recolección anterior con el filtrado. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto para eliminar la posibilidad de una posible transferencia de buffer AW2.

10. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado. Abrir con cuidado la columna y agregar 150 µl de buffer AE. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 minuto, y luego centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto.
11. Guardar a -20°C.

13.2. EXTRACCIÓN A PARTIR DE SANGRE

13.2.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre obtenidas por venopuntura para el diagnóstico molecular de paludismo.

13.2.2. Introducción

Las muestras de sangre pueden ser procesadas para la extracción de ADN mediante la utilización de kits comerciales para tal fin o mediante extracción con solventes orgánicos. Estos protocolos permiten trabajar con diferentes volúmenes de muestra de acuerdo a las necesidades.

13.2.3. Materiales

Equipos:

- Pipetas automáticas de volumen variable
- Microcentrífuga refrigerada
- Baño termostático
- Freezer -20°C
- Heladera 4°C

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Vortex
- Agitador magnético
- pHmetro

Materiales descartables:

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Tips de 1000 µl
- Tips de 200 µl
- Tips de 10 µl
- Guantes
- Cinta de pH

Reactivos

- Solución stock de Proteinasa K
- Buffer de lisis para Paludismo
- Buffer TE
- Fenol equilibrado
- Cloroformo-isoamílico (24:1)
- Acetato de sodio 3 M, pH 5.2
- Etanol 70%
- Etanol absoluto
- Agua bidestilada estéril
- Tris
- Dodecil sulfato de sodio (SDS).
- Cloruro de sodio

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- EDTA
- 8-hidroxiquinolina
- β -mercaptoetanol
- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio (en perlas)

13.2.4. Preparación de soluciones

Solución de Proteinasa K

Proteinasa K 20 mg

Agua bidestilada estéril 1 ml

Disolver y conservar en alícuotas de 20 μ l a -20°C .

Buffer de lisis para paludismo

Tris-HCl pH 8 10 mM

EDTA pH 8 10 mM

SDS 1 %

NaCl 10 mM

Conservar a 4°C . En el momento de usar agregar al volumen necesario de buffer, solución stock de Proteinasa K para alcanzar una concentración final de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Buffer TE

Tris-HCl, pH 8 10 mM

EDTA, pH 8 1 mM

Preparar con agua bidestilada

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Fenol equilibrado

1. El fenol licuificado debe ser mantenido a -20°C . Cuando se necesite, retirar el fenol del freezer, dejar calentar a temperatura ambiente y derretir a 68°C .
2. Agregar 8-hidroxiquinolina a una concentración final de 0.1%.
3. Al fenol derretido, agregar un volumen igual de buffer (generalmente Tris-HCl 0.5 M, pH 8) a temperatura ambiente.
4. Colocar en agitador magnético durante 15 minutos y luego apagar el agitador
5. Cuando las dos fases se hayan separado, aspirar tanto como sea posible de la fase superior (acuosa).
6. Agregar al fenol un volumen igual de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.
7. Repetir los pasos 4, 5.
8. Repetir las extracciones hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor a 7.8 (medido con cinta de pH)
9. Una vez que el fenol esté equilibrado y que la última fase acuosa sea removida, agregar 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M, pH 8 conteniendo 0.2% de β -mercaptoetanol.
10. La solución de fenol equilibrado puede ser guardada en frasco color caramelo a 4°C por períodos de hasta 1 mes.

Nota: El fenol es altamente corrosivo y puede causar quemaduras severas.

Cloroformo-isoamílico (24:1)

Cloroformo 96 ml

Alcohol isoamílico 4 ml

Conservar a 4°C .

Acetato de sodio 3 M, pH 5.2

Acetato de sodio . $3\text{H}_2\text{O}$ 40.8 g

Agua bidestilada 80.0 ml

Ajustar a pH 5.2 con ácido acético glacial. Llevar a volumen final de 100 ml con agua bidestilada.

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Tris-HCL 1 M pH 8

Tris	121.1 g
Agua bidestilada	800.0 ml

Ajustar a pH 8 agregando aproximadamente 42 ml de HCl concentrado. Ajustar a volumen final de 1000 ml con agua. Autoclavar.

Esta solución stock deberá ser diluída con agua bidestilada estéril para alcanzar las molaridades requeridas en cada caso.

Cloruro de sodio 5 M

Cloruro de sodio	292.2 g
Agua bidestilada	1000.0 ml

Alicuotar y autoclavar.

Utilizar como solución stock para alcanzar las molaridades requeridas.

EDTA 0.5 M, pH 8

EDTA- $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	186.1 g
Agua bidestilada	800.0 ml

Agitar en agitador magnético. Llevar a pH 8 con NaOH (aproximadamente 20 g de perlas).

Alicuotar y autoclavar.

Utilizar como solución stock para alcanzar las molaridades requeridas.

Etanol 70%

Etanol absoluto	70 ml
Agua bidestilada estéril	30 ml

13.2.5. Procedimiento

1. Realizar una alícuota de 300 μl de sangre
2. Lavar tres veces por centrifugación con 300 μl de buffer TE

Diagnóstico laboratorial de paludismo

3. Resuspender el pellet de sangre en 300 µl de buffer de lisis para Paludismo (conteniendo Proteinasa K).
4. Incubar 2 horas a 56°C en baño termostático
5. Agregar 300 µl de fenol equilibrado y vortexear.
6. Centrifugar a 3000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente
7. Recuperar la fase superior (acuosa) en tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 ml. Descartar la fase inferior (orgánica).
8. Agregar 150 µl de fenol equilibrado y 150 µl de cloroformo-isoamílico. Vortexear.
9. Repetir los pasos 6 y 7.
10. Agregar 300 µl de cloroformo-isoamílico y vortexear.
11. Repetir los pasos 6 y 7.
12. Agregar 0.1 volúmenes (30 µl) de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes (825 µl) de etanol absoluto frío. Mezclar por inversión.
13. Incubar a -20°C durante toda la noche.
14. Centrifugar durante 30 minutos a 4°C a 14000 rpm. (Marcar la posición del tubo que se ubica hacia el exterior de la microcentrífuga para identificar la posición del pellet).
15. Usando una micropipeta, descartar el líquido por el lado opuesto a la posición del pellet.
16. Agregar 500 µl de etanol 70%.
17. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.
18. Descartar el etanol como se describe en 15.
19. Drenar sobre papel de filtro y evaporar (puede emplearse vacío)
20. Disolver el pellet en 10 µl de agua bidestilada estéril.
21. Conservar a -20°C o -70°C.

13.2.6. Utilización de kit comercial

Podrá emplearse el kit comercial **QIAamp® DNA Mini Blood Kit**. Se llevarán a cabo los procedimientos de acuerdo a las instrucciones del fabricante para el protocolo de sangre (spin).

No se requiere extracción con fenol-cloroformo. El ADN se une específicamente a la membrana de sílica gel mientras los contaminantes pasan. Los inhibidores de la PCR, tales como los cationes divalentes y las proteínas, se eliminan por completo en dos etapas de lavado eficaces, dejando que el ácido nucleico puro se eluya en agua o en un buffer provisto con el kit.

Antes de comenzar

- Todos los pasos de centrifugación se llevan a cabo a temperatura ambiente (15-25°C).
- Equilibrar las muestras a temperatura ambiente (15-25°C).
- Calienta un baño termostático a 56°C.
- Equilibrar el buffer AE a temperatura ambiente.
- Asegurarse de que se hayan preparado correctamente los buffers AW1, buffer AW2 y Proteasa QIAGEN.
- Si se ha formado un precipitado en el tampón AL, disolver incubándolo a 56°C.

Procedimiento

1. Pipetear 20 µl de proteasa QIAGEN (o proteinasa K) en el fondo de un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
2. Agregar 200 µl de muestra de sangre al tubo de microcentrífuga y 4 µl de una solución madre de RNasa A (100 mg/ml) a la muestra.
3. Agregar 200 µl de buffer AL a la muestra. Vortexear por 15 segundos.
4. Incubar a 56°C durante 10 min.
5. Centrifugar brevemente el tubo de microcentrífuga para eliminar las gotas del interior de la tapa.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

6. Agregar 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra, y vortexear por 15 segundos. Después de mezclar, centrifugar brevemente el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para eliminar las gotas del interior de la tapa.
7. Aplicar cuidadosamente la mezcla del paso 6 a la columna QIAamp Mini spin (en un tubo de recolección de 2 ml) sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar la columna en un tubo limpio de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado. Cerrar cada columna para evitar la formación de aerosoles durante la centrifugación. Si el lisado no pasó completamente a través de la columna después de la centrifugación, centrifugar nuevamente a mayor velocidad hasta que la columna esté vacía.
8. Abrir con cuidado la columna y agregar 500 µl de buffer AW1 sin humedecer el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar la columna en un tubo de recolección limpio de 2 ml y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
9. Abrir con cuidado la columna y agregar 500 µl de buffer AW2 sin mojar el borde. Cerrar la tapa y centrifugar a velocidad máxima (20000 x g; 14000 rpm) durante 3 minutos.
10. Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y desechar el tubo de recolección anterior con el filtrado. Centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto para eliminar la posibilidad de una posible transferencia de buffer AW2.
11. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado. Abrir cuidadosamente la columna y añadir 200 µl de buffer AE. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 minutos, y luego centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto.
12. Guardar a -20°C.

CAPÍTULO 14: PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN

14.1. PCR PARA DIAGNÓSTICO DE *PLASMODIUM VIVAX*

14.1.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para llevar a cabo la reacción de PCR para amplificación de secuencia repetitiva de ADN de *P. vivax*.

14.1.2. Introducción

La técnica de PCR-Pv411 es un ensayo que detecta específicamente una secuencia repetitiva (1.5×10^3 copias/genoma haploide) de *P. vivax* de 411 pares de bases, con un límite de detección de 1.7 parásitos/ μ l de sangre (Carnevale y col., 2004).

14.1.3. Materiales

Equipos

- Termociclador
- Pipetas automáticas de volumen variable
- Freezer -20°C

Materiales descartables

- Tubos de pared delgada para PCR de 0.2 ml, tapa domo (utilizados para la reacción en sí)
- Tubos de microcentrífuga de 0.5 ml (utilizados para la preparación de reactivos)
- Tips de 10 μ l con filtro

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Tips de 200 µl con filtro
- Guantes

Reactivos

- Primers sintéticos
- dNTP Mix
- Taq DNA polimerasa
- Buffer de reacción 10X (con CLK)
- Cloruro de magnesio
- Agua bidestilada estéril

14.1.4. Preparación de soluciones

Primers sintéticos

Primer Pv411F 5'-TGTACATGGAAGCGCTAGCG-3'

Primer Pv411R 5'-ACTTCCACTTGACGCAGAAG-3'

(correspondientes a los extremos de una secuencia de ADN de *P. vivax* que contiene una secuencia repetitiva)

Preparar cada uno por separado a una concentración stock de 200 µM con agua bidestilada estéril.

La solución de trabajo se realizará diluyendo 1:10 la solución stock (concentración = 20 µM).

dNTP Mix

Preparar la mezcla de dCTP, dGTP, dTTP y dATP, a una concentración final de 25 mM de cada desoxinucleótido trifosfato.

Taq DNA polimerasa

Se usará enzima comercial con concentración de 5U/ μ l.

Buffer de reacción 10X

Se utilizará el buffer 10X provisto con la enzima por el proveedor.

El buffer 10X deberá tener la siguiente composición:

Cloruro de potasio (KCl)	500 mM
Tris-HCl, pH 8.8	100 mM
Nonidet P40	0.8 %

Cloruro de magnesio

Se usará cloruro de magnesio con concentración 25 mM.

14.1.5. Muestra

ADN genómico a una concentración de aproximadamente 100 ng/ μ l en agua bidestilada estéril.

Muestras de sangre anticoagulada

Extracción estándar: utilizar 2 μ l de ADN resuspendido.

Extracción con kit comercial: 1 μ l de ADN eluído.

Muestras de elutorios

Extracción estándar: utilizar 2 μ l de ADN resuspendido.

Extracción con kit comercial: 5 μ l de ADN eluído.

14.1.6. Procedimiento

1. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la cantidad de muestras que serán procesadas. Considerar que en cada reacción deberá adicionarse un control positivo de ADN, un control negativo de ADN, y un tubo conteniendo sólo mezcla de reacción (sin ADN).

Por cada tubo deberán combinarse los siguientes componentes, utilizando un tip con filtro diferente para cada ítem:

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Para 1 tubo en μ l
H ₂ O			35.40
Buffer 10X	100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, 0.8% Nonidet P40	10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40	5.00
Mg ₂ Cl	25 mM	1.5 mM	3.00
Primer Pv411 F	20 μ M	0.2 μ M	0.50
Primer Pv411 R	20 μ M	0.2 μ M	0.50
dNTP	25 mM c/u	200 μ M c/u	0.40
Taq DNA Polymerasa	5 U/ μ l	1 U	0.20
Templado ADN			5.00
Volumen final			50.00

2. Alicuotar la mezcla de reacción preparada en tubos de pared delgada (45 μ l/tubo).
3. En un cuarto independiente cargar la muestra de ADN (x μ l de acuerdo a muestra inicial y protocolo de extracción + z μ l de H₂O = 5 μ l).
4. Colocar los tubos en el termociclador.
5. Programar el equipo según el siguiente protocolo de amplificación:

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Desnaturalización a 98°C	60 segundos	} 30 ciclos
Desnaturalización a 94°C	60 segundos	
Annealing a 45°C	60 segundos	
Extensión a 72°C	60 segundos	
Extensión final a 72°C	5 minutos	
Refrigeración a 4°C		

- Colocar a funcionar el termociclador según el programa descripto.
- Después de la reacción de PCR, analizar 15 µl de los productos de amplificación por electroforesis en geles de agarosa. El amplicón esperado es de 411 pares de bases (pb).
- Fotografiar.

14.2. PCR ANIDADA PARA DIAGNÓSTICO DE *P. FALCIPARUM*, *P. VIVAX*, *P. MALARIAE* Y *P. OVALE*

14.2.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para llevar a cabo la reacción de PCR anidada para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.

14.2.2. Introducción

Esta PCR anidada para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale* (Snounou y col., 1993; modificada por Johnston y col., 2006), será llevada a cabo ante sospecha de infecciones mixtas.

El protocolo se basa en la amplificación de fragmentos del gen de la subunidad pequeña del ARN ribosomal. Dos primers género específicos son usados para el primer round de amplificación. Una alícuota del producto del primer round es usada para un segundo round de

amplificación, en cual cada especie de parásito es detectada por separado utilizando primers especies-específicos. Los tamaños de los amplicones específicos son diferentes para cada especie: 205 pb para *P. falciparum*, 120 pb para *P. vivax*, 144 pb para *P. malariae* y 800 pb para *P. ovale*.

14.2.3. Materiales

Equipos

- Termociclador
- Pipetas automáticas de volumen variable
- Freezer -20°C

Materiales descartables

- Tubos de pared delgada para PCR de 0.2 ml, tapa domo (utilizados para la reacción en sí)
- Tubos de microcentrífuga de 0.5 ml (utilizados para la preparación de reactivos)
- Tips de 10 μl con filtro
- Tips de 200 μl con filtro
- Guantes

Reactivos

- Primers sintéticos
- dNTP Mix
- Taq DNA polimerasa
- Buffer de reacción 10X (con CLK)
- Cloruro de magnesio
- Agua bidestilada estéril

14.2.4. Preparación de soluciones

Primers sintéticos

Primer rPLU 6 5'- TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'

Primer rPLU 5 5'- CCTGTTGTTGCCTTAACTTC-3'

(correspondientes a los primers genéricos, utilizados en round 1)

Primer rFAL 1 5'-TTAAACTGGTTTGGGAAAACCAAATATATT-3'

Primer rFAL 2 5'- ACACAATGAACTCAATCATGACTACCCGTC-3'

(correspondientes a los primers específicos para *P. falciparum*, utilizados en round 2)

Primer rVIV 1 5'-CGCTTCTAGCTTAATCCACATAACTGATAC-3'

Primer rVIV 2 5'-ACTTCCAAGCCGAAGCAAAGAAAGTCCTTA-3'

(correspondientes a los primers específicos para *P. vivax*, utilizados en round 2)

Primer rMAL 1 5'-ATAACATAGTTGTACGTTAAGAATAACCGC-3'

Primer rMAL 2 5'-AAAATTCCCATGCATAAAAAATTATACAAA-3'

(correspondientes a los primers específicos para *P. malariae*, utilizados en round 2)

Primer rOVA 1 5'-ATCTCTTTTGCTATTTTTTAGTATTGGAGA-3'

Primer rOVA 2 5'-GGAAAAGGACACATTAATTGTATCCTAGTG-3'

(correspondientes a los primers específicos para *P. ovale*, utilizados en round 2)

Preparar cada uno por separado a una concentración stock de 200 μ M con agua bidestilada estéril.

La solución de trabajo se realizará diluyendo 1:10 la solución stock (concentración = 20 μ M).

dNTP Mix

Preparar la mezcla de dCTP, dGTP, dTTP y dATP, a una concentración final de 25 mM de cada desoxinucleótido trifosfato.

Taq DNA polimerasa

Se usará enzima comercial con concentración de 5U/ μ l.

Buffer de reacción 10X

Se utilizará el buffer 10X provisto con la enzima por el proveedor.

El buffer 10X deberá tener la siguiente composición:

Cloruro de potasio (KCl) 500 mM

Tris-HCl, pH 8.05 150 mM

Cloruro de magnesio

Se usará cloruro de magnesio con concentración 25 mM.

14.2.5. Muestra

ADN genómico a una concentración de aproximadamente 100 ng/ μ l en agua bidestilada estéril.

Muestras de sangre anticoagulada

Extracción estándar: utilizar 2 μ l de ADN resuspendido.

Extracción con kit comercial: 1 μ l de ADN eluído.

Muestras de elutórios

Extracción estándar: utilizar 2 μ l de ADN resuspendido.

Extracción con kit comercial: 5 μ l de ADN eluído.

14.2.6. Procedimiento

Primer round

1. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la cantidad de muestras que serán procesadas. Considerar que en cada reacción deberá adicionarse un control positivo de ADN, un control negativo de ADN, y un tubo conteniendo sólo mezcla de reacción (sin ADN).

Por cada tubo deberán combinarse los siguientes componentes, utilizando un tip con filtro diferente para cada ítem:

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Para 1 tubo en μ l
H ₂ O			13.30
Buffer 10X	150 mM Tris-HCl (pH 8.05), 500 mM KCl	15 mM Tris-HCl (pH 8.05), 50 mM KCl	2.50
Mg ₂ Cl	25 mM	2.5 mM	2.50
Primer rPLU 6	20 μ M	0.4 μ M	0.50
Primer rPLU 5	20 μ M	0.4 μ M	0.50
dNTP	25 mM c/u	200 μ M c/u	0.20
Hot Start Taq DNA Polymerasa	5 U/ μ l	2.5 U	0.50
Templado ADN			5.00
Volumen final			25.00

2. Alicuotar la mezcla de reacción preparada en tubos de pared delgada (20 μ l/tubo).
3. En un cuarto independiente cargar la muestra de ADN (x μ l de acuerdo a muestra inicial y protocolo de extracción + z μ l de H₂O = 5 μ l).
4. Colocar los tubos en el termociclador.
5. Programar el equipo según el siguiente protocolo de amplificación:

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*

Desnaturalización a 95°C	5 minutos	} 30 ciclos
Desnaturalización a 94°C	1 minutos	
Annealing a 60°C	2 minutos	
Extensión a 72°C	2 minutos	
Extensión final a 72°C	5 minutos	
Refrigeración a 4°C		

Para *P. ovale*

Desnaturalización a 95°C	5 minutos	} 30 ciclos
Desnaturalización a 94°C	30 segundos	
Annealing a 45°C	30 segundos	
Extensión a 72°C	90 segundos	
Extensión final a 72°C	5 minutos	
Refrigeración a 4°C		

- Colocar a funcionar el termociclador según el programa descripto.
- Después del primer round de PCR, sembrar el segundo round de amplificación con 1 µl de los productos de amplificación

Segundo round

- Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la cantidad de muestras que serán procesadas. Considerar que en cada reacción deberá adicionarse un tubo conteniendo sólo mezcla de reacción (sin ADN).

Por cada tubo deberán combinarse los siguientes componentes, utilizando un tip con filtro diferente para cada ítem:

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Para 1 tubo en μ l
H ₂ O			17.30
Buffer 10X	150 mM Tris-HCl (pH 8.05), 500 mM KCl	15 mM Tris-HCl (pH 8.05), 50 mM KCl	2.50
Mg ₂ Cl	25 mM	2.5 mM	2.50
Primer F*	20 uM	0.4 uM	0.50
Primer R*	20 uM	0.4 uM	0.50
dNTP	25 mM c/u	200 uM c/u	0.20
Hot Start Taq DNA Polymerasa	5 U/ul	2.5 U	0.50
Amplicón round 1			1.00
Volumen final			25.00

* Utilizar el set de primers correspondiente a cada especie en 4 tubos separados.

- Alicuotar la mezcla de reacción preparada en tubos de pared delgada (24 μ l/tubo).
- En un cuarto independiente cargar los productos de amplificación del primer round (1 μ l), siendo los provenientes de la reacción con annealing a 60°C para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y los provenientes de la reacción con annealing a 45°C para *P. ovale*.
- Colocar los tubos en el termociclador.
- Programar el equipo según el siguiente protocolo de amplificación:

Para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*

Desnaturalización a 95°C	5 minutos	} 30 ciclos
Desnaturalización a 94°C	1 minutos	
Annealing a 55°C	2 minutos	
Extensión a 72°C	2 minutos	
Extensión final a 72°C	5 minutos	
Refrigeración a 4°C		

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Para *P. ovale*

Desnaturalización a 95°C	5 minutos	
Desnaturalización a 94°C	30 segundos	} 30 ciclos
Annealing a 45°C	30 segundos	
Extensión a 72°C	90 segundos	
Extensión final a 72°C	5 minutos	
Refrigeración a 4°C		

- Colocar a funcionar el termociclador según el programa descripto.
- Después de la reacción de PCR, analizar 10 µl de los productos de amplificación por electroforesis en geles de agarosa. Los amplicones específicos esperados para cada especie son: 205 pb para *P. falciparum*, 120 pb para *P. vivax*, 144 pb para *P. malariae* y 800 pb para *P. ovale*. Puede observarse un fragmento de aprox. 1.1 kb correspondiente al producto del primer round de amplificación.
- Fotografiar.

14.3. PCR ANIDADA PARA DIAGNÓSTICO DE *P. KNOWLESI*

14.3.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para llevar a cabo la reacción de PCR anidada para *P. knowlesi*.

14.3.2. Introducción

La infección por *P. knowlesi* en un humano podría pasar desapercibida como tal en la rutina de laboratorios, donde probablemente sería diagnosticado como *P. malariae*, o si solo los anillos están presentes, como *P. falciparum*. Las similitudes morfológicas entre *P. knowlesi* y *P. malariae*

dificultan la identificación correcta por microscopía y hacen necesario el uso de métodos moleculares.

La reacción de PCR anidada es más sensible y específica que la microscopía para la detección de parásitos de la malaria y debería emplearse en el estudio de las infecciones emergentes atípicas de malaria por *P. knowlesi* (Singh y col., 2004; modificada por Ng y col., 2008).

14.3.3. Materiales

Equipos

- Termociclador
- Pipetas automáticas de volumen variable (otras diferentes a las utilizadas para la extracción de ADN y la electroforesis)
- Freezer -20°C

Materiales descartables

- Tubos de pared delgada para PCR de 0.2 ml, tapa domo (utilizados para la reacción en sí)
- Tubos de microcentrífuga de 0.5 ml (utilizados para la preparación de reactivos)
- Tips de 10 μl con filtro
- Tips de 200 μl con filtro
- Guantes

Reactivos

- Primers sintéticos
- dNTP Mix
- Taq DNA polimerasa
- Buffer de reacción 10X (con CLK)

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Cloruro de magnesio
- Agua bidestilada estéril

14.3.4. Preparación de soluciones

Primers sintéticos

Primer rPLU 1 5'-TCAAAGAATAAGCCATGCAAGTGA-3'

Primer rPLU 2 5'-TACCCTGTTGTTGCCTTAAACTCC-3'

(correspondientes a los primers genéricos, utilizados en round 1)

Primer Pmk8 5'-GTTAGCGAGAGCCACAAAAAGCGAAT-3'

Primer Pmk9 5'-ACTCAAAGTAACAAAATCTTCCGTA-3'

(correspondientes a los primers específicos para *P. knowlesi*, utilizados en round 2)

Preparar cada uno por separado a una concentración stock de 250 μ M con agua bidestilada estéril.

La solución de trabajo se realizará diluyendo 1:10 la solución stock (concentración = 25 μ M).

dNTP Mix

Preparar la mezcla de dCTP, dGTP, dTTP y dATP, a una concentración final de 25 mM de cada desoxinucleótido trifosfato.

Taq DNA polimerasa

Se usará enzima comercial con concentración de 5U/ μ l.

Buffer de reacción 10X

Se utilizará el buffer 10X provisto con la enzima por el proveedor.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

El buffer 10X deberá tener la siguiente composición:

Cloruro de potasio (KCl)	500 mM
Tris-HCl, pH 8.8	100 mM
Nonidet P40	0.8 %

Cloruro de magnesio

Se usará cloruro de magnesio con concentración 25 mM.

14.3.5. Muestra

ADN genómico a una concentración de aproximadamente 100 ng/ μ l en agua bidestilada estéril.

Muestras de sangre anticoagulada

Extracción estándar: utilizar 2 μ l de ADN resuspendido.

Extracción con kit comercial: 1 μ l de ADN eluído.

Muestras de elutórios

Extracción estándar: utilizar 2 μ l de ADN resuspendido.

Extracción con kit comercial: 5 μ l de ADN eluído.

14.3.6. Procedimiento

Primer round

1. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la cantidad de muestras que serán procesadas. Considerar que en cada reacción deberá adicionarse un control positivo de ADN, un control negativo de ADN, y un tubo conteniendo sólo mezcla de reacción (sin ADN).

Por cada tubo deberán combinarse los siguientes componentes, utilizando un tip con filtro diferente para cada ítem:

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Para 1 tubo en μ l
H ₂ O			30.35
Buffer 10X	100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl	10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl	5.00
Mg ₂ Cl	25 mM	4.0 mM	8
Primer rPLU 1	25 μ M	0.25 μ M	0.50
Primer rPLU 2	25 μ M	0.25 μ M	0.50
dNTP	25 mM c/u	200 μ M c/u	0.40
Taq DNA Polymerasa	5 U/ μ l	1.25 U	0.25
Templado ADN			5.00
Volumen final			50.00

- Alicuotar la mezcla de reacción preparada en tubos de pared delgada (45 μ l/tubo).
- En un cuarto independiente cargar la muestra de ADN (x μ l de acuerdo a muestra inicial y protocolo de extracción + z μ l de H₂O = 5 μ l).
- Colocar los tubos en el termociclador.
- Programar el equipo según el siguiente protocolo de amplificación:

Desnaturalización a 94°C	4 minutos	
Desnaturalización a 94°C	30 segundos	} 30 ciclos
Annealing a 55°C	60 segundos	
Extensión a 72°C	60 segundos	
Extensión final a 72°C	4 minutos	
Refrigeración a 4°C		

- Colocar a funcionar el termociclador según el programa descripto.
- Después del primer round de PCR, sembrar el segundo round de amplificación con 2 μ l de los productos de amplificación

Segundo round

- Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la cantidad de muestras que serán procesadas. Considerar que en cada reacción deberá adicionarse un tubo conteniendo sólo mezcla de reacción (sin ADN).

Por cada tubo deberán combinarse los siguientes componentes, utilizando un tip con filtro diferente para cada ítem:

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Para 1 tubo en μ l
H ₂ O			11.99
Buffer 10X	100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl	10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl	2.00
Mg ₂ Cl	25 mM	4.0 mM	3.20
Primer F*	25 μ M	0.25 μ M	0.20
Primer R*	25 μ M	0.25 μ M	0.20
dNTP	25 mM c/u	200 μ M c/u	0.16
Hot Start Taq DNA Polymerasa	5 U/ μ l	1.25 U	0.25
Amplicón round 1			2.00
Volumen final			20.00

- Alicuotar la mezcla de reacción preparada en tubos de pared delgada (18 μ l/tubo).
- En un cuarto independiente cargar los productos de amplificación del primer round (2 μ l).
- Colocar los tubos en el termociclador.
- Programar el equipo según el siguiente protocolo de amplificación:

Desnaturalización a 95°C	5 minutos	
Desnaturalización a 94°C	30 segundos	} 30 ciclos
Annealing a 60°C	30 segundos	
Extensión a 72°C	90 segundos	
Extensión final a 72°C	5 minutos	
Refrigeración a 4°C		

6. Colocar a funcionar el termociclador según el programa descripto.
7. Después de la reacción de PCR, analizar 10 µl de los productos de amplificación por electroforesis en geles de agarosa. El amplicón esperado es de 153 pb.
8. Fotografiar.

14.4. PCR EN TIEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DE *P. FALCIPARUM*, *P. VIVAX*, *P. MALARIAE* Y *P. OVALE*

14.4.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para llevar a cabo la reacción de PCR en tiempo real para *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*.

14.4.2. Introducción

Los métodos de PCR en tiempo real son un desarrollo reciente de las metodologías de PCR. Usan marcadores fluorescentes para monitoreo continuo de la formación de amplicones durante todo el tiempo de la reacción. Las ventajas que poseen estas técnicas son la posibilidad de cuantificación de patógenos, menor riesgo de contaminación y disponibilidad de resultados dentro de las 3 horas.

Este protocolo corresponde a una PCR en tiempo real multiplex cuantitativa para la detección simultánea de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, empleando sondas TaqMan (Rougemont y col., 2004).

14.4.3. Materiales

Equipos

- Equipo termociclador para PCR en tiempo real (Applied Biosystems)
- Pipetas automáticas de volumen variable
- Freezer -20°C
- Heladera

Materiales descartables

- Tubos para PCR en tiempo real de 0.2 ml, en tiras de 8, con tiras de tapas
- Tubos de microcentrífuga de 0.5 ml (utilizados para la preparación de reactivos)
- Tips de 10 μl con filtro
- Tips de 200 μl con filtro
- Guantes

Reactivos

- Primers sintéticos
- Sondas sintéticas marcadas
- TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems)
- Agua bidestilada estéril

14.4.4. Preparación de soluciones

Primers sintéticos

Primer Plasmio 1 5'-GTTAAGGGAGTGAAGACGATCAGA-3'

Primer Plasmio 2 5'-AACCCAAAGACTTTGATTTCTCATAA-3'

(para amplificar un fragmento de 157 a 165 pb de los genes del ARNr18S de las 4 especies de plasmodios)

Preparar cada uno por separado a una concentración stock de 200 μM con agua bidestilada estéril.

La solución de trabajo se realizará diluyendo 1:10 la solución stock (concentración = 20 μM).

Sondas sintéticas

Plasprobe 5'-FAM-ACCGTCGTAATCTTAACCATAAACTATGCCGACTAG-TAMRA-3'
(diseñada para detectar *Plasmodium* sp.)

Falcprobe 5'-FAM-AGCAATCTAAAAGTCACCTCGAAAGATGACT-TAMRA-3'
(diseñada para detectar *P. falciparum*)

Vivprobe 5'-VIC-AGCAATCTAAGAATAAACTCCGAAGAGAAAATTCT-TAMRA-3'
(diseñada para detectar *P. vivax*)

Malaprobe 5'-FAM-CTATCTAAAAGAACTCAT-3'
(diseñada para detectar *P. malariae*)

Ovaprobe 5'-VIC-CGAAAGGAATTTTCTTATT-3'
(diseñada para detectar *P. ovale*)

Preparar cada una a una concentración stock de 200 μM con agua bidestilada estéril.

La solución de trabajo se realizará diluyendo 1:20 la solución stock (concentración = 10 μM).

TaqMan Universal Master Mix

Es provista por el fabricante a concentración 2X.

Contiene:

AmpliAq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)

Uracil-N glycosylase (UNG)

dNTPs with dUTP

ROX™ Passive Reference

Buffer optimizado

14.4.5. Muestra

Muestras de sangre anticoagulada

Extracción con kit comercial: 1 µl de ADN eluído.

Muestras de elutorios

Extracción con kit comercial: 5 µl de ADN eluído.

14.4.6. Procedimiento

1. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo a la cantidad de muestras que serán procesadas. Considerar que en cada reacción deberá adicionarse un control positivo de ADN, un control negativo de ADN, y un tubo conteniendo sólo mezcla de reacción (sin ADN). Las reacciones se llevarán a cabo por duplicado. Por cada muestra y controles se llevarán a cabo 3 reacciones.

Por cada tubo deberán combinarse los siguientes componentes, utilizando un tip con filtro diferente para cada ítem:

Diagnóstico laboratorial de paludismo
Reacción simple de screening

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Para 1 tubo en μ l
H ₂ O			6.875
TaqMan Universal Master Mix	2X	1X	12.500
Primer Plasmó 1	20 μ M	0.2 μ M	0.250
Primer Plasmó 2	20 μ M	0.2 μ M	0.250
Sonda Plasprobe	10 μ M	50 nM	0.125
Templado ADN			5.000
Volumen final			25.000

Reacción doble 1 específica

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Para 1 tubo en μ l
H ₂ O			6.600
TaqMan Universal Master Mix	2X	1X	12.500
Primer Plasmó 1	20 μ M	0.2 μ M	0.250
Primer Plasmó 2	20 μ M	0.2 μ M	0.250
Sonda Falcprobe	10 μ M	80 nM	0.20
Sonda Vivprobe	10 μ M	80 nM	0.20
Templado ADN			5.00
Volumen final			25.00

Reacción doble 2 específica

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Para 1 tubo en μ l
H ₂ O			6.600
TaqMan Universal Master Mix	2X	1X	12.500
Primer Plasmó 1	20 μ M	0.2 μ M	0.250
Primer Plasmó 2	20 μ M	0.2 μ M	0.250
Sonda Malaprobe	10 μ M	80 nM	0.20
Sonda Ovaprobe	10 μ M	80 nM	0.20
Templado ADN			5.00
Volumen final			25.00

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Alicuotar la mezcla de reacción preparada en tubos de PCR en tiempo real (20 μ l/tubo).
- En un cuarto independiente cargar la muestra de ADN (x μ l de acuerdo a muestra inicial + z μ l de H₂O = 5 μ l).
- Colocar los tubos en el equipo de PCR en tiempo real.
- Programar el equipo según el siguiente protocolo de amplificación:

Paso inicial a 50°C	2 minutos	
Desnaturalización a 95°C	10 minutos	
Paso 1 a 95°C	15 segundos	} 45 ciclos
Paso 2 a 60°C	60 segundos	

- Colocar a funcionar el equipo según el programa descripto.
- Analizar los resultados. Se considerará negativa una muestra con $Ct > 40$.

CAPÍTULO 15: ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

15.1. FUNDAMENTOS

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas al ser sometidas a un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos están cargados de forma negativa debido a su esqueleto de grupos fosfato. Por lo tanto, en una electroforesis, los ácidos nucleicos migrarán hacia el polo positivo, es decir, hacia el ánodo. Al desplazarse a través de una matriz porosa, como por ejemplo un gel de agarosa, las moléculas de DNA son sometidas a dos fuerzas de acción opuestas que determinan la velocidad de la partícula en cuestión. Por un lado, la fuerza eléctrica, que la atrae al electrodo, cuya intensidad es directamente proporcional a la carga, y, de acuerdo a la segunda ley de Newton ($F=m \times a$, entonces $a=F/m$), les impone una aceleración directamente proporcional al cociente carga/masa (q/m). Por otro lado, la fuerza de rozamiento, que se opone a la migración con una intensidad que depende del tamaño y la forma de la partícula y de las características del medio (por ejemplo, viscosidad y estructura).

La electroforesis se utiliza en el laboratorio para separar macromoléculas en solución, en forma analítica (es decir, sólo para verlas) o preparativa (para purificarlas). Los ácidos nucleicos tienen un fosfato cargado negativamente por cada nucleótido. Como el peso molecular de los cuatro nucleótidos es similar, la relación q/m es independiente de la secuencia y el tamaño de la molécula. Por lo tanto, la aceleración impuesta por la fuerza eléctrica es igual para cualquier molécula de ácido nucleico. La única diferencia en velocidad de migración estará dada por diferencias en la fuerza de rozamiento, o sea de su forma y de su tamaño. En el caso del DNA doble cadena, suponiendo por ejemplo que todas las moléculas son fragmentos lineales, la forma es la misma para cualquier molécula, entonces las distintas moléculas tendrán una velocidad que sólo dependerá de su tamaño, es decir, de su longitud en pares de bases. Sin embargo, si tratáramos de separar moléculas de DNA doble cadena en una electroforesis en una solución acuosa, nos encontraríamos con que el rozamiento impuesto por ésta es tan pequeño que todas las moléculas migrarían juntas. Además, durante la electroforesis, las moléculas se separarían


unas de otras por difusión, impidiendo el análisis. Para lograr una separación eficiente, se utiliza un medio soporte que aumente considerablemente la fricción recibida por las macromoléculas y reduzca la difusión a un mínimo. Este medio suele ser una red molecular de algún polímero orgánico, conocida como gel, por su consistencia gelatinosa. Los más utilizados en el laboratorio de biología molecular son de agarosa, un derivado del agar-agar, un polisacárido extraído de un alga que, al disolverlo, forma una red estabilizada por interacciones no covalentes. Las mezclas de DNAs de distinto tamaño se hacen migrar (correr, en la jerga de laboratorio) a través del gel durante un cierto tiempo y se obtiene una separación en la que la distancia migrada por una molécula dada es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular (o de su longitud en pares de bases). El tamaño de una muestra incógnita puede estimarse corriendo en paralelo muestras de longitud conocida.

15.1.1. Concentración de agarosa y rango de resolución

Regulando el porcentaje de agarosa en el gel se puede regular el tamaño del poro. A mayor porcentaje (poro más chico) todos los fragmentos migrarán más lentamente, pero podremos observar diferencias de pocas bases en los fragmentos más chicos. A menor porcentaje (poro más grande), todos los fragmentos chicos correrán muy rápidamente, pero podremos resolver fragmentos de más alto peso molecular.

15.1.2. Determinación del tamaño de los fragmentos

Si analizamos fragmentos de DNA con la misma conformación (por ejemplo lineales) la migración de los fragmentos es inversamente proporcional al logaritmo (\log_{10}) del peso molecular de los mismos o de su longitud en pares de bases (pb). Gracias a esta propiedad, es posible inferir en forma aproximada el tamaño de fragmentos de longitud desconocida comparando la migración de los mismos con la de muestras de tamaños conocidos.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 140 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

15.2. CONDICIONES DE SEGURIDAD

- Los reactivos utilizados en este procedimiento tienen la característica de ser tóxicos, irritantes, corrosivos, cancerígenos, mutagénicos y neurotóxicos, por lo tanto el operador siempre deberá usar guantes, mascarillas y lentes protectores para evitar un contacto directo o accidental con ellos (Ver más adelante lista de estos reactivos).
- La luz ultravioleta (UV) empleada para la visualización de ADN a 385 nm de longitud de onda con 8W de potencia ocasiona graves daños oculares y epiteliales, por lo tanto, el operador deberá contar con una lámina de policarbonato transparente ubicada entre la lámpara y el punto de observación y lentes de protección contra rayos UV del mismo material o utilizar equipos cerrados para documentación. El voltaje utilizado para la electroforesis puede generar quemaduras por descarga eléctrica. Aunque la mayoría de cámaras de electroforesis han sido diseñadas para evitar el contacto directo con la electricidad, el operador deberá asegurarse de mantener la fuente poder apagada o desconectada al momento de manipular el equipo.

15.3. PROTOCOLO DE TRABAJO

15.3.1. Propósito

Describir los pasos a seguir para llevar a cabo la electroforesis en gel de agarosa de muestras de ADN.

15.3.2. Introducción

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de

diferente tamaño van a migrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de tamaño molecular (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA en estudio.

En este protocolo se utilizará la técnica de electroforesis en geles de agarosa en dos momentos:

- para determinar la calidad y cantidad de ADN genómico extraído a partir de la muestra de sangre (antes de la reacción de PCR);
- para analizar los productos de PCR (amplicones).

15.3.3. Materiales

Equipos

- Pipetas automáticas de volumen variable
- Cuba de electroforesis submarina completa (con bandeja de preparación y peines)
- Fuente de poder
- Equipo de documentación de geles con transiluminador UV y software de análisis y cuantificación
- Horno microondas

Materiales descartables

- Tubos de microcentrífuga de 0.5 ml
- Tips de 200 μ l
- Tips de 10 μ l
- Guantes

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Reactivos

- Agarosa (para ácidos nucleicos)
- Buffer TAE 1X
- SYBR Green I
- Buffer de siembra 6X con ABF
- Buffer de siembra 6X con XC
- Marcadores de tamaño molecular 100 bp ladder (concentración 100 ng/ μ l)
- Marcador de cantidad de ADN de bajo rango
- Agua bidestilada
- Tris
- EDTA
- Ácido acético glacial
- Ácido clorhídrico
- Azul de bromofenol
- Xilencianol
- Sacarosa

15.3.4. Preparación de soluciones

Buffer TAE 50X

Tris	242.0 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M, pH 8	100.0 ml
Agua bidestilada c.s.p.	1000 ml

Esta solución stock deberá ser diluída 50 veces con agua destilada para alcanzar la concentración 1X (20 ml de solución stock + 980 ml de agua).

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Buffer de siembra 6X con ABF

Azul de bromofenol	25 mg
Sacarosa	4 g
Agua bidestilada c.s.p.	10 ml

Conservar a 4°C.

Buffer de siembra 6X con XC

Xilencianol	25 mg
Sacarosa	4 g
Agua bidestilada c.s.p.	10 ml

Conservar a 4°C.

Tris-HCL 1 M pH 8

Tris	121.1 g
Agua bidestilada	800.0 ml

Ajustar a pH 8 agregando aproximadamente 42 ml de HCl concentrado. Ajustar a volumen final de 1000 ml con agua. Autoclavar.

Esta solución stock deberá ser diluída con agua bidestilada estéril para alcanzar las molaridades requeridas en cada caso.

EDTA 0.5 M, pH 8

EDTA-Na ₂ .2 H ₂ O	186.1 g
Agua bidestilada	800.0 ml

Agitar en agitador magnético. Llevar a pH 8 con NaOH (aproximadamente 20 g de perlas). Alicuotar y autoclavar.

Utilizar como solución stock para alcanzar las molaridades requeridas.

15.3.5. Muestra

La muestra debe ser ADN en solución. Corresponderá a:

- ADN genómico extraído a partir de la muestra de sangre, para determinar la calidad y cantidad antes de la reacción de PCR
- Amplicones, para analizar los productos de PCR.

15.3.6. Procedimiento para ADN genómico

1. Preparar agarosa 0.8 % en buffer TAE 1X.

Nota: El volumen utilizado dependerá del tamaño de la bandeja de preparación de la cuba electroforética.

2. Solubilizar por calentamiento en horno microondas y dejar enfriar a 50-60°C
3. Armar la bandeja de preparación de acuerdo a las instrucciones del fabricante (utilizando bordes plásticos provistos con el equipo) y colocar el peine.
4. Agregar SYBR Green I a la agarosa y mezclar (1 µl de reactivo/10 ml de solución de agarosa).
5. Verter la mezcla en la bandeja armada sin formar burbujas.
6. Dejar endurecer el gel (aproximadamente 20-30 minutos) hasta que se torne opaco y retirar los bordes.
7. Agregar buffer TAE 1X en los tanques de la cuba.
8. Colocar el gel en la cuba y quitar suavemente el peine.
9. Cubrir completamente el gel con buffer de corrida (TAE 1X), aproximadamente 5 mm sobre el gel.
10. Preparar las muestras:

ADN genómico: 2 µL de ADN genómico + 3 µL de agua + 1 µL de buffer de siembra 6X con ABF.

11. Sembrar las muestras de ADN en cada calle del gel. Cargar en una calle un marcador de tamaño molecular y en otra calle marcador de cantidad.

12. Conectar la cuba a la fuente de poder. Realizar la electroforesis a 2 V/cm de largo de gel.
13. Luego de la electroforesis, colocar el gel en equipo de documentación y observar las bandas teñidas.
14. Fotografiar.
15. Estimar la cantidad de ADN utilizando software de cuantificación.

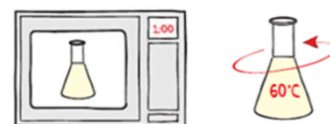
15.3.7. Procedimiento para productos de amplificación

1. Preparar agarosa en buffer TAE 1X a concentración de 1.2 % para protocolo de PCR simple y 2% para protocolos de PCR anidada.

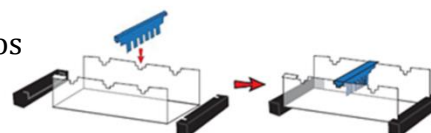


Nota: El volumen utilizado dependerá del tamaño de la bandeja de preparación de la cuba electroforética.

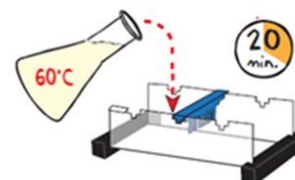
16. Solubilizar por calentamiento en horno microondas y dejar enfriar a 50-60°C



17. Armar la bandeja de preparación de acuerdo a las instrucciones del fabricante (utilizando bordes plásticos provistos con el equipo) y colocar el peine.

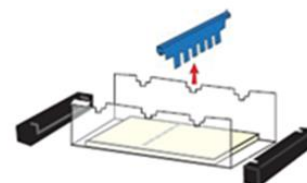


18. Agregar SYBR Green I a la agarosa y mezclar (1 µl de reactivo/10 ml de solución de agarosa).



19. Verter la mezcla en la bandeja armada sin formar burbujas.

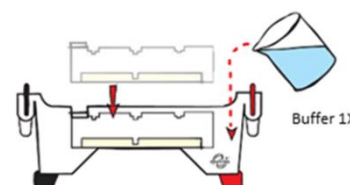
20. Dejar endurecer el gel (aproximadamente 20-30 minutos) hasta que se torne opaco y retirar los bordes.



21. Agregar buffer TAE 1X en los tanques de la cuba.

22. Colocar el gel en la cuba y quitar suavemente el peine.

23. Cubrir completamente el gel con buffer de corrida (TAE 1X), aproximadamente 5 mm sobre el gel.



Diagnóstico laboratorial de paludismo

24. Preparar las muestras:

Amplicones de PCR simple: 15 μ L de ADN + 3 μ L de buffer de siembra 6X con XC.

Amplicones de PCR anidada: 10 μ L de ADN + 2 μ L de buffer de siembra 6X con XC.

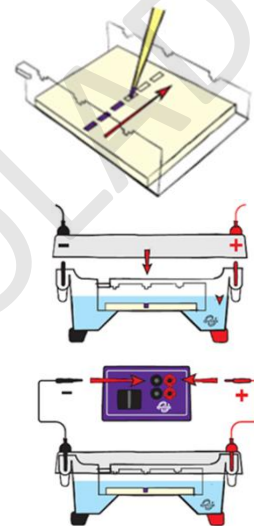
25. Sembrar las muestras de ADN en cada calle del gel. Cargar en una calle un marcador de tamaño molecular.

26. Conectar la cuba a la fuente de poder. Realizar la electroforesis a 2 V/cm de largo de gel.

27. Luego de la electroforesis, colocar el gel en equipo de documentación y observar las bandas teñidas.

28. Fotografiar.

29. Estimar el tamaño molecular mediante comparación con marcadores.



SECCIÓN V

ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO

COPIA NO CONTROLADA

CAPÍTULO 16: SISTEMA NACIONAL DE LABORATORIOS DE REFERENCIA Y REDES DE LABORATORIO (SNLRR)

16.1. FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA


La sistematización de laboratorios nacionales de referencia y de redes temáticas de laboratorio tiene como objetivos la organización y la integración del diagnóstico de referencia en el marco de las estrategias nacionales de vigilancia de la salud.

La vigilancia de la salud consiste en la recolección sistemática, el análisis y la comunicación de información relevante, oportuna y de calidad para las acciones de las distintas instancias de salud pública en materia de prevención o de reducción del impacto de enfermedades y riesgos para la salud, y el acceso a los servicios de salud de las personas afectadas.

En 1960, la Ley 15.465 crea el régimen legal de las enfermedades de notificación obligatoria y en el artículo 4° establece que "están obligados a la notificación el laboratorista y el anatomopatólogo que hayan realizado exámenes que comprueban o que permiten sospechar la enfermedad". En 2007, la Res. 1715 del Ministerio de Salud redefine los eventos de notificación obligatoria (ENO) y los mecanismos de la vigilancia en el Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS), y describe el rol de los laboratorios en el Sistema de Vigilancia de Laboratorio.

La vigilancia de laboratorio, a través del diagnóstico etiológico de las sospechas clínicas, los estudios de tamizaje poblacional y el seguimiento de los enfermos y de individuos expuestos a riesgos, genera información oportuna y confiable para la implementación de acciones clínicas y sanitarias apropiadas. Entre otros beneficios, esta herramienta permite conocer el estado de las condiciones de salud, el impacto que tienen los programas de salud pública y la situación específica de los grupos expuestos a esas enfermedades.

La Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud - ANLIS- "Dr. Carlos G. Malbrán" es la sede del SNLRR. Si bien esta Administración fue establecida en 1996 para

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 149 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

centralizar la gestión de 11 Institutos y Centros Nacionales dependientes del Ministerio de Salud de la Nación, tiene su origen en el Instituto Nacional de Higiene, fundado en 1892 por el entonces Departamento Nacional de Higiene.

La Red de Laboratorios tiene como objetivo posibilitar el acceso de todos los habitantes a estudios de laboratorio de cualquier complejidad, con iguales criterios de especificidad y sensibilidad, asegurando la atención igualitaria a toda la población. Esta tarea resulta de vital importancia dado que los laboratorios de salud pública constituyen una de las primeras barreras contra la enfermedad.

El Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” es Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) del Ministerio de Salud en Paludismo, y coordina la Red Nacional de Laboratorios en el tema, por resolución ministerial 70 del año 2014.

16.1.1. Funciones de Laboratorio Nacional de Referencia

El Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, como Laboratorio Nacional de Referencia tiene las funciones de:

Diagnóstico de referencia

- Disponer de métodos de laboratorio actualizados y validados
- Verificar los resultados de pruebas de diagnóstico realizadas por laboratorios externos.

Vigilancia epidemiológica

- Conocer las normas nacionales de vigilancia y notificar al SNVS en tiempo y forma.
- Proporcionar capacidad de respuesta en los planes nacionales de preparación para brotes y asesoramiento y apoyo técnico para la investigación de brotes ya ocurridos.

Normatización y calidad

- Evaluar el desempeño de reactivos comerciales y/o artesanales de uso diagnóstico.
- Desarrollar, validar y verificar métodos y algoritmos para el diagnóstico y la notificación de enfermedades bajo vigilancia
- Implementar y mantener procesos de gestión de calidad y de riesgo biológico.
- Participar en programas de control externo de la calidad de laboratorios para asegurar la confiabilidad de los resultados de diagnóstico.
- Desarrollar y promover programas de control de calidad en los laboratorios integrantes de las redes temáticas de laboratorio.
- Cumplir con la Ley Nacional 25.326 de Protección de Datos Personales y las normativas aplicables al transporte de material de riesgo.

Asesoramiento científico y cooperación

- Prover asesoramiento científico sobre la interpretación y la aplicación de los resultados de laboratorio a las autoridades y los profesionales de salud pública.
- Proporcionar apoyo técnico y recomendaciones a las autoridades para la formulación de políticas.
- Desarrollar programas e instrumentos para el fortalecimiento técnico y la capacitación de los recursos humanos de los laboratorios integrantes de las redes nacionales.
- Coordinar actividades de investigación o de vigilancia con organismos internacionales con el objetivo de promover la calidad y el desarrollo de las actividades de los laboratorios de referencia y contribuir a la vigilancia internacional para el control global de enfermedades.

Investigación, desarrollo y producción

- Generar conocimiento técnico-científico.
- Desarrollar, validar y transferir nuevas tecnologías de diagnóstico.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

- Desarrollar y/o producir reactivos de laboratorio necesarios para cumplir las funciones de referencia y vigilancia y que no se encuentren disponibles o accesibles.
- Desarrollar y mantener -conforme a normas internacionales-, o tener acceso a materiales de referencia.
- Contribuir a la disponibilidad de reactivos estratégicos y materiales de referencia en los laboratorios de las redes nacionales.

16.1.2. Funciones de Coordinación de la Red Temática de Laboratorio

El Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, en su rol de Coordinación de la Red Temática de Laboratorio tiene las funciones de: resolución de los diagnósticos, programas de control de calidad, distribución de reactivos u otros insumos y capacitación y transferencia de tecnologías.

16.2. FUNCIONES ESPECÍFICAS SEGÚN NIVELES

16.2.1. Laboratorio Nacional de Referencia

El Laboratorio Nacional de Referencia es el Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

Sus funciones son:

- Realizar funciones de referencia nacional para el diagnóstico de paludismo.
- Establecer las normas referentes a métodos y técnicas junto a sus procedimientos estandarizados.
- Formar al personal nuevo y actualizar al existente en las técnicas normadas
- Coordinar las actividades con los Laboratorios Jurisdiccionales.
- Ejercer supervisión directa e indirecta a los laboratorios jurisdiccionales de la Red.

- Participar en programas de control de calidad a nivel internacional.
- Utilizar adecuadamente el SNVS.

16.2.2. Laboratorios Jurisdiccionales

Son las instituciones designadas por cada Jurisdicción (23 Provincias y Ciudad Autónoma de Buenos Aires) como Referente Jurisdiccional Temático de Paludismo. Sus funciones son:

- Realizar el diagnóstico microscópico de paludismo de la zona geográfica correspondiente.
- Capacitar al personal en la toma de muestra, coloración y diagnóstico microscópico de acuerdo a los Procedimientos Operativos Estándar (POE) para el Diagnóstico de paludismo.
- Supervisar la realización del diagnóstico microscópico en su Red jurisdiccional e implementar las medidas correctivas de acuerdo a los resultados.
- Realizar el control de calidad del diagnóstico microscópico de paludismo en su Red de Laboratorios e implementar las medidas correctivas de acuerdo a los resultados.
- Enviar los informes de la supervisión directa y control de calidad realizado a su Red.
- Remitir láminas inmediatamente o trimestralmente, según tipo de vigilancia, al Laboratorio Nacional de Referencia.
- Utilizar adecuadamente el SNVS.

16.2.3. Laboratorios Periféricos

Son los laboratorios de los Hospitales Provinciales y Municipales, Centros de Salud, sedes operativas del Ministerio de Salud:

- Tomar muestras por demanda en su establecimiento de salud y realizar el diagnóstico microscópico de estas muestras, de acuerdo a los POE para el Diagnóstico de paludismo.
- Remitir láminas al Laboratorio jurisdiccional, según lineamientos establecidos para el Control de Calidad.
- Utilizar adecuadamente el SNVS.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Además de estas instituciones, la Red Nacional de Laboratorios para el diagnóstico de paludismo podrá incluir instituciones privadas que así lo soliciten, con el propósito de aumentar la cobertura del diagnóstico en todo el país. Estas instituciones tendrán nivel de periférico

COPIA NO CONTROLADA

CAPÍTULO 17: CONTROL DE CALIDAD EN EL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE PALUDISMO

El control de calidad es el conjunto de procedimientos que aplica el laboratorio para vigilar constantemente las operaciones y resultados con el fin de decidir si los resultados son lo bastante exactos y precisos para ser comunicados.

El control de calidad del diagnóstico microscópico del paludismo ejecutado por la red de laboratorios se efectúa bajo las modalidades:

- Revisión de láminas diagnosticadas (control indirecto).
- Evaluación nacional de competencias (control directo).

17.1. REVISIÓN DE LÁMINAS DIAGNOSTICADAS O CONTROL INDIRECTO

17.1.1. Control de calidad en muestras obtenidas por búsqueda pasiva

Este control de calidad se realiza a través de:

- Revisión por parte del nivel jurisdiccional de las láminas diagnosticadas y entregadas inmediatamente por el nivel local.
- Revisión por parte del nivel nacional de las láminas revisadas por el nivel jurisdiccional, entregadas inmediatamente.

El personal responsable de cada unidad de diagnóstico local (laboratorios periféricos) debe enviar inmediatamente al nivel jurisdiccional el 100% de láminas positivas y 100% de láminas negativas.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

El referente jurisdiccional temático debe enviar inmediatamente al laboratorio de referencia nacional el 100% de láminas positivas y 100% de láminas negativas.

Los costos de las derivaciones de muestras del nivel periférico al jurisdiccional y del jurisdiccional del nacional estarán a cargo del Ministerio de Salud.

La derivación de caso será a través del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS).

17.1.2. Control de calidad en muestras obtenidas por búsqueda activa

Este control de calidad se realiza a través de:

- Revisión por parte del nivel jurisdiccional de las láminas diagnosticadas y entregadas semanalmente por el nivel local.
- Revisión por parte del nivel nacional de las láminas revisadas por el nivel jurisdiccional, entregadas trimestralmente.

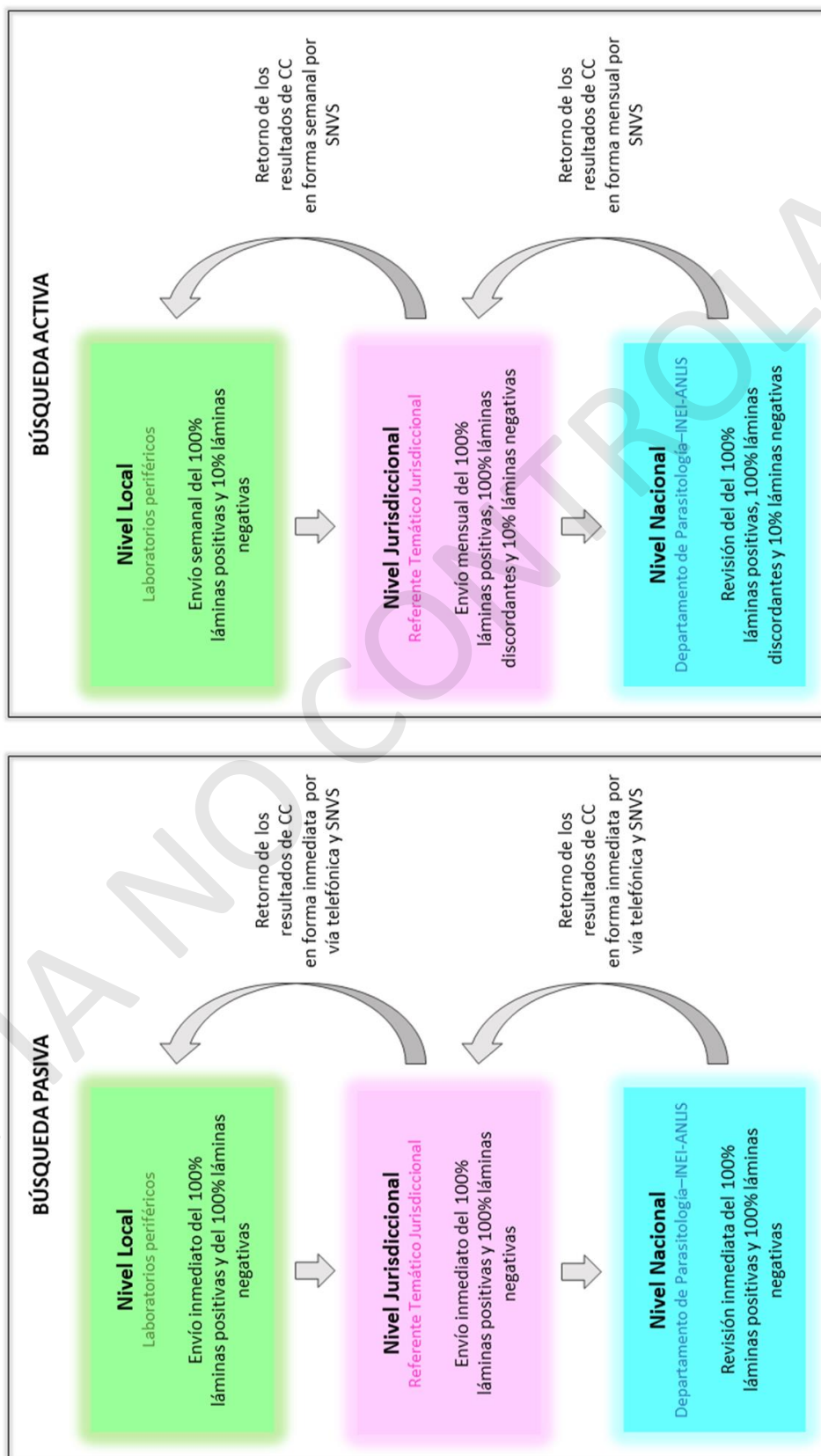
El personal responsable de cada unidad de diagnóstico local, debe enviar semanalmente al nivel jurisdiccional el 100% de láminas positivas y 10% de láminas negativas.

El referente jurisdiccional temático debe enviar mensualmente al laboratorio de referencia nacional el 100% de láminas positivas, 100% de láminas discordantes y 10% de láminas negativas.

Los costos de las derivaciones de muestras del nivel periférico al jurisdiccional y del jurisdiccional del nacional estarán a cargo del Ministerio de Salud.

La derivación de caso será a través del Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS).

Diagnóstico laboratorial de paludismo



Flujograma de control de calidad

17.1.3. Procedimiento para las láminas diagnosticadas o revisadas

Se debe evaluar la calidad técnica de la preparación de la muestra, gota gruesa y extendido hemático, de acuerdo a los siguientes criterios:

- Toma de muestra: Identificación; tamaño, ubicación y grosor.
- Coloración: deshemoglobinización, tonalidad y precipitados.

Se debe elaborar un informe con los resultados del control de calidad anual incluyendo la evaluación de la calidad técnica de la preparación.

Evaluación de la calidad técnica de la preparación de muestras

Los resultados de la calidad técnica de las láminas para cada laboratorio o unidad de diagnóstico se tabulan para estimar los siguientes valores como porcentaje de error en:

- Identificación
- Tamaño
- Ubicación
- Grosor
- Deshemoglobinización
- Tonalidad
- Precipitado

Indicadores:

% concordancia en la identificación de la muestra: número de láminas con una identificación aceptable/ total de láminas por cien (100)

% concordancia en el tamaño de la muestra: número de láminas con tamaño aceptable / total de láminas por cien (100)

% concordancia en la ubicación de la muestra: número de láminas con ubicación aceptable / total de láminas por cien (100)

Diagnóstico laboratorial de paludismo

% Concordancia en el grosor de la muestra: número de láminas con grosor Aceptable / total de láminas por cien (100)

% concordancia en deshemoglobinización de la muestra: número de láminas con deshemoglobinización aceptable / total de láminas por cien (100)

% concordancia en la tonalidad de la coloración: número de láminas con tonalidad aceptable / total de láminas por cien (100)

% concordancia en las muestras con precipitado: número de muestras con precipitación aceptable/total de láminas por cien (100)

Evaluación técnica o concordancia del diagnóstico microscópico

La concordancia se estima preparando cuadros 2 x 2 para cada referente jurisdiccional temático. Se estiman los siguientes valores: porcentaje de falsos positivos (% FP), porcentaje de falsos negativos (% FN), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), % de sensibilidad y % de especificidad.

Para interpretar los resultados, se debe tomar en cuenta que las láminas revisadas no representan la población de todas las láminas sino solamente 100% de láminas positivas, 100% de las discordantes y 10% de láminas negativas. Por lo tanto, el VPP y VPN tendrán sentido solamente para los datos verdaderos del personal que realiza el diagnóstico. La verdadera sensibilidad y especificidad son determinadas solo si la proporción de láminas positivas a negativas representa la población de todas las láminas.

17.2. EVALUACIÓN NACIONAL DE COMPETENCIAS O CONTROL DIRECTO

17.2.1. Antecedentes

La implementación de políticas que garanticen acceso a un tratamiento adecuado se fundamenta necesariamente en la existencia de un sistema de atención que ofrezca con oportunidad acceso a un diagnóstico confiable. La calidad en la preparación y lectura de los preparados hemáticos en paludismo requiere de la existencia de procedimientos y herramientas que permitan promover y monitorear la calidad del diagnóstico con base en la estructura de la red de laboratorios.

La necesidad de que los laboratorios jurisdiccionales temáticos de paludismo cuenten con un Programa de Evaluación nacional de las competencias, para evaluar del desempeño de las personas realizando diagnóstico microscópico para paludismo, es la razón de este protocolo. Este programa permite no sólo reforzar el diagnóstico de paludismo a nivel de los centros de referencia jurisdiccionales, sino que permite el intercambio de capacidades y el fortalecimiento de los recursos a nivel de las provincias.

17.2.2. Propósito

Establecer el procedimiento técnico para la organización, diseño y evaluación de los Laboratorios de Referencia Jurisdiccionales de Argentina para el diagnóstico microscópico de paludismo, con la finalidad de implementar un sistema de gestión de calidad eficiente y contribuir al fortalecimiento de la vigilancia del diagnóstico de paludismo en Argentina.

17.2.3. Alcance

Se aplica a los Laboratorios de Referencia Jurisdiccional de Argentina, que de forma voluntaria y por escrito acepten participar en el control de calidad directo para el diagnóstico microscópico de paludismo, a realizarse mediante el envío de paneles de láminas.

17.2.4. Definiciones

- **Concordancia:** Expresión en porcentaje de la conformidad de los resultados de un determinado ensayo, obtenidos por diferentes laboratorios o analistas.
- **Control de calidad:** Conjunto de acciones que se aplican durante la ejecución de cada proceso para asegurar que los resultados, productos o servicios pueden ser entregados.
- **Discordancia:** Expresión en porcentaje de la disconformidad de los resultados de un determinado ensayo, obtenidos por diferentes laboratorios o analistas.
- **Evaluación externa:** Sistema de comparación retrospectivo, periódico y objetivo de los resultados de diferentes laboratorios por medio de encuestas organizadas por un ente externo independiente.
- **Laboratorio Evaluado:** Es el laboratorio que es evaluado por un laboratorio supervisor de acuerdo a los niveles de complejidad.
- **Laboratorio Evaluador:** Es el laboratorio que evalúa la calidad de los procedimientos de diagnóstico realizados por los laboratorios de nivel inmediato inferior.
- **Muestras panel:** muestras de láminas de gota gruesa y frotis que son preparadas en laboratorio. Incluye diferentes especies, estadíos y densidades parasitarias.
- **Muestras Positivas:** muestras hemáticas de sangre total, parasitadas con el género *Plasmodium*.
- **Muestras Negativas:** muestras de personas clínicamente sanas y con diagnóstico microscópico de gota gruesa negativo.
- **Sistema de gestión de calidad:** Programa total de normas, procesos y procedimientos que asegura de manera continua que los servicios, productos o resultados finales son confiables y oportunos.


17.2.5. Organización

La preparación de las láminas está a cargo del Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", correspondiente al Laboratorio de Referencia Nacional de Paludismo, con la colaboración de los Laboratorios Supranacionales de Malaria del Programa Regional de Malaria de OPS/OMS. El armado y el envío de los paneles están a cargo del Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", correspondiente al Laboratorio de Referencia Nacional de Paludismo.

17.2.6. Metodología

Los paneles son elaborados bajo los siguientes lineamientos de acuerdo a las guías de OPS/OMS para el diagnóstico de la malaria y el desarrollo del PEED:

- Se incluyen láminas con preparaciones de gota gruesa y extendido hemático.
- El número de láminas por panel es de diez.
- Deben elaborarse grupos de paneles uniformes entre sí respecto a las características de las láminas (especie, parasitemia), de forma que la evaluación sea comparable cuando se usen paneles del mismo tipo para evaluar distintos laboratorios.
- Las láminas deben incluir especies presentes en la región y diagnósticos diferenciales, infecciones mixtas, diferentes densidades parasitarias y muestras negativas.
- Cada lámina es asignada con un código de la siguiente manera:
Ej. PXXX-ZZZ. Donde P representa Paludismo, XXX será el número del panel a enviarse y ZZZ es el número de lámina. Ejemplo: P001-009, representa Panel 1 de Paludismo, lámina 9.
- Cada panel enviado va acompañado de un instructivo para completar los resultados obtenidos correspondientes a la evaluación del panel.
- El laboratorio de referencia elabora un informe por cada lámina, con fotografía.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
Diagnóstico laboratorial de paludismo		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 162 de 210

17.2.7. Frecuencia de la evaluación

Se evalúa con una frecuencia anual. El envío de paneles es realizado con rotación de los mismos.

Se lleva a cabo un envío a 6 jurisdicciones por trimestre, completándose el envío a las 24 jurisdicciones en el plazo de un año. Se rige con año calendario.

17.2.8. Modalidades de envío de los paneles


El envío de cada panel de láminas es realizado a través del sistema de correo aéreo mediante cuenta institucional de ANLIS.

Los paneles deben ser devueltos por cada laboratorio evaluado por la misma vía de envío. El plazo de devolución es no mayor a 2 meses luego de enviados los resultados.

17.2.9. Compromisos para las instituciones participantes

Nivel de Referencia Nacional

- Dar sostenibilidad al control directo - evaluación nacional de competencias para el diagnóstico de paludismo a través de la elaboración de los paneles y el seguimiento y gestión del sistema.
- Dar cumplimiento a las normas técnicas para el diagnóstico de paludismo de acuerdo a los Procedimientos Operativos Estándar del Departamento de Parasitología del INEI-ANLIS.
- Ante eventos no previstos desarrollar reuniones técnicas o asistencia directa para dar respuesta a los mismos.
- El Departamento de Parasitología del INEI-ANLIS es evaluado anualmente en el marco del Programa de Evaluación Externa del Desempeño para el Diagnóstico Microscópico de Malaria, Programa Regional de Malaria, Organización Panamericana de la Salud.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 163 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

Nivel Jurisdiccional

- El Director o jefe de los Laboratorios de Referencia de cada jurisdicción aceptan por escrito participar voluntariamente en el programa y brindan todas las facilidades de gestión necesarias para el desarrollo del mismo, incluyendo la devolución de paneles.
- El (los) responsable(s) del Laboratorio Referencial de Paludismo de la jurisdicción a cargo de la actividad, revisa/n las láminas de los paneles preparados y da respuesta en el tiempo previsto.
- Promover la participación de los niveles periféricos en los programas de evaluación, para el fortalecimiento de la red de laboratorios a nivel nacional.

17.2.10. Plazo de respuesta de los participantes

El Laboratorio evaluado emite sus resultados al Laboratorio de Referencia Nacional correspondiente en un plazo no mayor de 10 días hábiles después de haber recibido el panel de láminas.

Los resultados son enviados por vía electrónica en un formato diseñado para esta actividad, donde los participantes contarán con un código de acceso de la página web de ANLIS, Plataforma Virtual de Información Georreferenciada y Gestión de Redes de Laboratorios de Salud Pública, para emitir los resultados correspondientes.

17.2.11. Modelo estadístico para el análisis de los resultados

La evaluación de concordancia o discordancia está en función al puntaje obtenido de las láminas evaluadas correctamente, sobre el puntaje Ideal:

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

Puntaje ideal

17.2.12. Estándares de calidad

Para tener en cuenta el nivel de concordancia aceptable que debe obtener el laboratorio evaluado, se debe considerar los siguientes estándares de calidad:

- Concordancia de presencia o ausencia de parásito: 100%
- Concordancia de especie: 95% - 100%
- Concordancia de parasitemia: 80% - 100%
- Concordancia del estadio: 80% - 100%


17.2.13. Criterios de evaluación

Concordancia en resultado: Se refiere a la evaluación del resultado emitido en cuanto al reconocimiento de láminas con *Plasmodium* y de las negativas.

Concordancia en especie: Se refiere a la evaluación del resultado emitido en cuanto al reconocimiento de cada especie que se encuentra presente en las láminas positivas que conforman el panel. En el caso de las láminas mixtas, deberá reconocerse las especies que lo conforman, si el laboratorio evaluado reconoce sólo una de las especies, se considerará la mitad del puntaje que corresponde a la lámina correctamente evaluada.

Concordancia en parasitemia: Se refiere a la evaluación del resultado emitido en cuanto al reconocimiento de la cantidad exacta de los parásitos en la lámina positiva, expresada en parásitos por microlitro, considerando que no debe haber diferencias en más del 50% entre una lectura y otra.

Concordancia en estadio: Se refiere a la evaluación del resultado emitido en cuanto al reconocimiento del estadio sexual y asexual del *Plasmodium* presente en las láminas positivas.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 165 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

17.2.14. Plazo para la respuesta del laboratorio evaluador

El Laboratorio de Referencia Nacional emite un informe oficial con el compilado de los resultados, el análisis de los mismos y las principales recomendaciones, donde los laboratorios evaluados aparecerán con su código otorgado, de modo que todos tengan este informe colectivo, pero cada uno tendrá únicamente los resultados detallados de las láminas correspondientes a su panel evaluado para identificar sus propios resultados. Este informe se remite en un plazo no mayor de un mes, después de haber recibido los resultados de los laboratorios jurisdiccionales evaluados, y correspondiente al primer mes del año calendario posterior al de la evaluación.

17.2.15. Constancia de participación

Los participantes en este tipo de evaluación reciben una constancia de participación siempre y cuando hayan remitido sus resultados, la cual se obtendrá mediante descarga de la página web de Plataforma Virtual de Información Georreferenciada y Gestión de Redes de Laboratorios de Salud Pública. Esta constancia es entregada independiente de haber obtenido alto o bajo porcentaje de concordancia. El certificado de aprobación es otorgado a aquellos laboratorios participantes que hayan obtenido un nivel adecuado a los estándares de calidad de concordancia previamente descriptos y es enviado junto con el informe oficial.

17.2.16. Implementación de las recomendaciones

El laboratorio evaluador debe tener en cuenta a los laboratorios cuyos resultados están fuera del margen de aceptación.

Los laboratorios evaluados que obtienen resultados de baja concordancia reciben apoyo técnico de parte del Laboratorio de Referencia Nacional para realizar un reforzamiento del diagnóstico microscópico de paludismo.

El personal de laboratorio que ejecuta la lectura microscópica de las láminas de los paneles y que obtiene resultados de baja concordancia, debe participar en un reforzamiento de las competencias técnicas a cargo del Laboratorio de Referencia Nacional.

17.2.17. Archivo de los reportes

Los reportes se mantendrán archivados de la siguiente manera: a nivel de los laboratorios evaluados, cada jurisdicción guardará copia de sus resultados; a nivel del Laboratorio Nacional de Referencia, éste guardará en formato electrónico los resultados e informes correspondientes a sus jurisdicciones evaluadas.

El período de custodia para el archivo electrónico es de 5 años.

17.3. CAPACITACIÓN

El Laboratorio Nacional de Referencia deberá:

- Capacitar a los referentes temáticos jurisdiccionales de Paludismo en los Procedimientos Operativos Estándar (POE) para la realización de un diagnóstico de paludismo de calidad.
- Cooperar en la capacitación del personal de los laboratorios del nivel periférico en el diagnóstico de paludismo.

La financiación de las actividades de capacitación estará a cargo del Ministerio de Salud.

La capacitación será realizada en tres formatos:

- Curso de Paludismo, teórico-práctico, integral, para el equipo de salud.
- Taller de certificación, para certificación de competencias en el diagnóstico microscópico de paludismo.
- Pasantías prolongadas, con planes individuales, dependiendo de las capacidades que requieran fortalecer.

17.4. SUPERVISIÓN

Es un proceso educativo y motivador recíproco, permanente, regulador y planificado, que permite desarrollar los conocimientos y la capacidad del personal, crear aptitudes respecto al trabajo y contribuir a mantener la eficacia y eficiencia de una Red de Laboratorios organizados, para el diagnóstico microscópico de paludismo.

Los Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico de Paludismo descriptos aquí constituirán la base para ejercer la supervisión de los laboratorios de la Red Nacional. La supervisión se aplicará en dos modalidades directa e indirecta.

17.4.1. Supervisión directa

Es una evaluación formalizada efectuada por el nivel superior (Laboratorio de Referencia Nacional a Laboratorios de Referencia Jurisdiccionales y éstos a los Laboratorios Periféricos).

Es una forma de observación directa del desempeño por medio de visitas programadas y periódicas al personal de los laboratorios de la Red para observar directamente las condiciones de trabajo, así como los procedimientos técnicos y administrativos. Por el contacto personal, es efectiva y rápida, ya que nos permite tomar decisiones oportunas. Durante la supervisión directa se realizan entrevistas al personal encargado de procesar muestras de pacientes sospechosos de paludismo para conocer directamente las condiciones de trabajo, así como los problemas que se presentan en los laboratorios, para recomendar soluciones apropiadas de acuerdo a los recursos locales. Se observarán los siguientes aspectos: local, personal, equipamiento, materiales, reactivos, procedimientos técnicos, registros, control de calidad.

Al finalizar la supervisión se debe realizar una reunión informativa para discutir la situación encontrada, hacer las sugerencias necesarias y las recomendaciones. Posteriormente se debe elaborar un informe escrito, breve y concreto con los compromisos adquiridos del personal periférico, jurisdiccional y nacional. El laboratorio supervisor, conjuntamente con el supervisado deberá diseñar un plan de intervención y cronograma para períodos de 3 – 6 meses.

17.4.2. Supervisión directa

Se ejercerá a través de la revisión y análisis de los resultados del laboratorio en el SNVS. El nivel nacional analizará la información proveniente de los niveles jurisdiccionales y éstos a su vez serán responsables de analizar la información de los niveles periféricos.

Como resultado de la supervisión directa, se dictarán recomendaciones y se podrá tomar decisiones tendientes a corregir los errores detectados.

17.4.3. Responsabilidades en la supervisión

El Laboratorio Nacional de Referencia deberá:

- Supervisar anualmente a todos los laboratorios de referencia jurisdiccionales, incluyendo la actualización de la base de datos de la Red de Laboratorios jurisdiccionales.
- Realizar medidas correctivas y/o acciones necesarias (readiestramiento, supervisión estricta, etc.) de acuerdo a los resultados de la supervisión y del control de calidad fundamentado en los criterios establecidos de aceptación de error.


El Laboratorio Jurisdiccional de Referencia deberá:

- Supervisar cada trimestre a todas las unidades de diagnóstico periféricas, incluyendo la presentación de un informe al Laboratorio Nacional.
- Realizar medidas correctivas y/o acciones necesarias (readiestramiento, supervisión estricta, etc.) de acuerdo a los resultados de la supervisión y del control de calidad fundamentado en los criterios establecidos de aceptación de error.

Todos los niveles deberán:

- Cumplir con los procesos de garantía de calidad en el diagnóstico de paludismo (evaluación externa directa y/o indirecta del desempeño) descritos por el laboratorio Nacional.

La financiación de TODAS las actividades de supervisión estará a cargo del Ministerio de Salud.

	Manual operativo	Código MO-PR-01 Versión 00
		Fecha de vigencia: 12-04-2018 Página 169 de 210
Diagnóstico laboratorial de paludismo		

17.5. RESPONSABILIDADES EN EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

- El Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de la ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, como Laboratorio Nacional de Referencia de Paludismo, y coordinador de la Red Nacional de Laboratorios en el tema, garantizará el diagnóstico referencial, la normatización y calidad, el asesoramiento científico, la capacitación y la investigación.
- Las Jurisdicciones, representadas por el Referente Jurisdiccional de Redes de Laboratorio, garantizarán las coordinaciones y buen funcionamiento de los equipos locales que participan en el diagnóstico de paludismo.
- La Dirección Nacional de Epidemiología garantizará la coordinación de las actividades de vigilancia.
- La OPS/OMS proveerá el asesoramiento técnico para monitorear el seguimiento y facilitará la colaboración SUR-SUR.
- Todos los niveles de diagnóstico asistencial deberán tomar muestra de gota gruesa y extendido hemático.
- La detección por búsqueda pasiva, la atención y el seguimiento de los casos se realizará en cada unidad de salud y estará bajo la responsabilidad del equipo local.
- La vigilancia por búsqueda activa y control de foco estará bajo responsabilidad de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud.

SECCIÓN VI

BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

COPIA NO CONTROLADA

CAPÍTULO 18: DOCUMENTACION DE REFERENCIA

- Alger J, Matute ML, Mejía RE. 2006. Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico Microscópico de la Malaria. Secretaría de Salud, Tegucigalpa.
- Carnevale S, Velásquez JN, del Portillo H, Labbé JH, Cabrera MG, Ferella M, Andersson B, Guarnera EA, Angel SO. 2004. Identification and characterization of an interspersed repetitive DNA fragment in *Plasmodium vivax*, and its possible use for parasite detection. *Exp Parasitol* 108: 81-88.
- Organización Panamericana de la Salud. 2017. Marco para la eliminación de la malaria.
- Organización Panamericana de la Salud. Guía para la implementación de un sistema de gestión de calidad en el diagnóstico microscópico de malaria: Estandarización de procedimientos y herramientas sobre el control de calidad y la evaluación externa del desempeño en las redes de laboratorio. OPS/DPC/CD/M/393/06
- Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jatton K. 2004. Detection of Four *Plasmodium* Species in Blood from Humans by 18S rRNA Gene Subunit-Based and Species-Specific Real-Time PCR Assays. *J Clin Microbiol* 42: 5636-5643.
- Singh B, Kim Sung L, Matusop A, Radhakrishnan A, Shamsul SS, Cox-Singh J, Thomas A, Conway DJ. 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *Lancet* 363: 1017-1024.
- Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. 1993. High sensitivity detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol* 61: 315-320.
- World Health Organization. 1975. Manual para el diagnóstico microscópico de malaria. 4ta. Edición. Ginebra. Publicación científica Nº 276. p.1-105
- World Health Organization. 2000. Bench aids for the diagnosis of malaria infections, 2nd ed. Geneva.

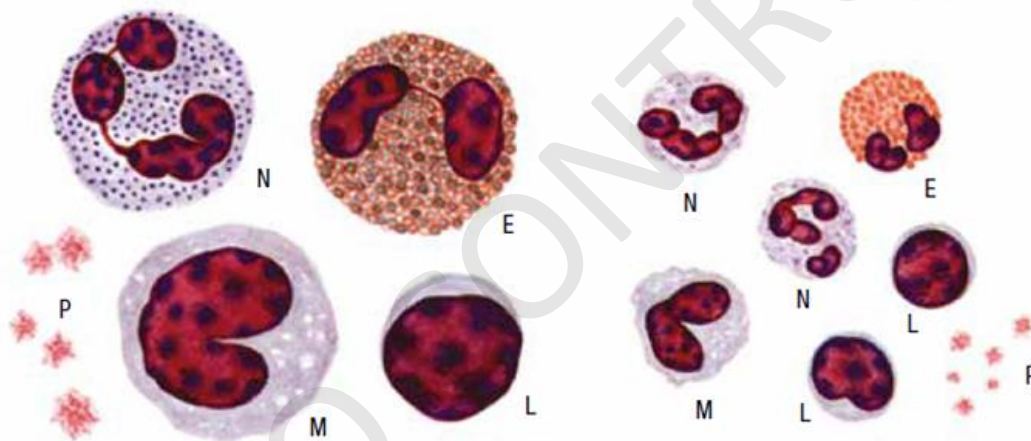
Diagnóstico laboratorial de paludismo

- World Health Organization. 2000. New Perspectives Malaria Diagnosis Report of a joint WHO/USAID informal consultation.
- World Health Organization. 2006. Informal consultation on quality control of malaria microscopy.
- World Health Organization. 2009. Guía sobre la reglamentación relativa al transporte de sustancias infecciosas 2009–2010. WHO/HSE/EPR/2008.10.
- World Health Organization. 2010. Basic malaria microscopy. Part I Learner's guide. Second Edition. Geneva.
- World Health Organization. 2010. Basic malaria microscopy. Part II Tutor's guide. Second edition. Geneva.
- World Health Organization. 2014. Policy brief on malaria diagnostics in low-transmission settings.
- World Health Organization. 2016. Malaria Microscopy Quality Assurance Manual – Version 2.
- World Health Organization. 2016. Recommended selection criteria for procurement of malaria rapid diagnostic tests.

CAPÍTULO 19: ANEXOS

19.1. GRÁFICOS AUXILIARES DE OMS PARA DIAGNÓSTICO DE PALUDISMO

Aspecto de los componentes de la sangre en las extensiones finas y gruesas

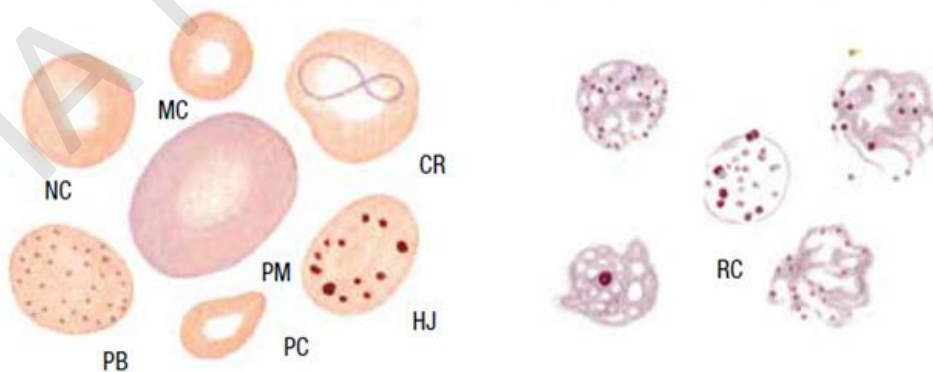


Extensión fina

GLÓBULOS BLANCOS

Extensión gruesa

N = Neutrófilo, E= Eosinófilo, M = Monocito, L = Linfocito, P = Plaquetas



Extensión fina

GLÓBULOS ROJOS

Extensión gruesa

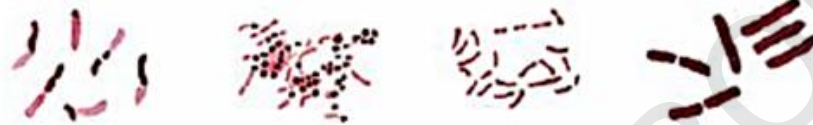
NC = Normocito, MC = Microcito, PM = Macrocito policromático, PC = Poiquilocito, PB = Basofilia puntiforme, CR = Anillo de Cabot, HJ = Cuerpos de Howell-Jolly, RC = 'Nubes' reticulares y cuerpos cromatoides en la anemia grave

Diagnóstico laboratorial de paludismo

Artefactos y contaminantes que pueden generar confusión



ELEMENTOS DE LA SANGRE



BACTERIAS

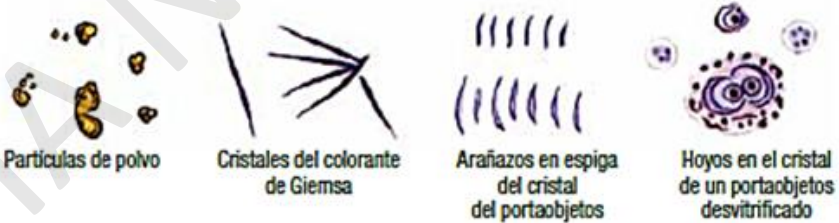


ESPORAS



CÉLULAS VEGETALES

HIFAS Y ESPORAS HONGOS



FUENTES DIVERSAS

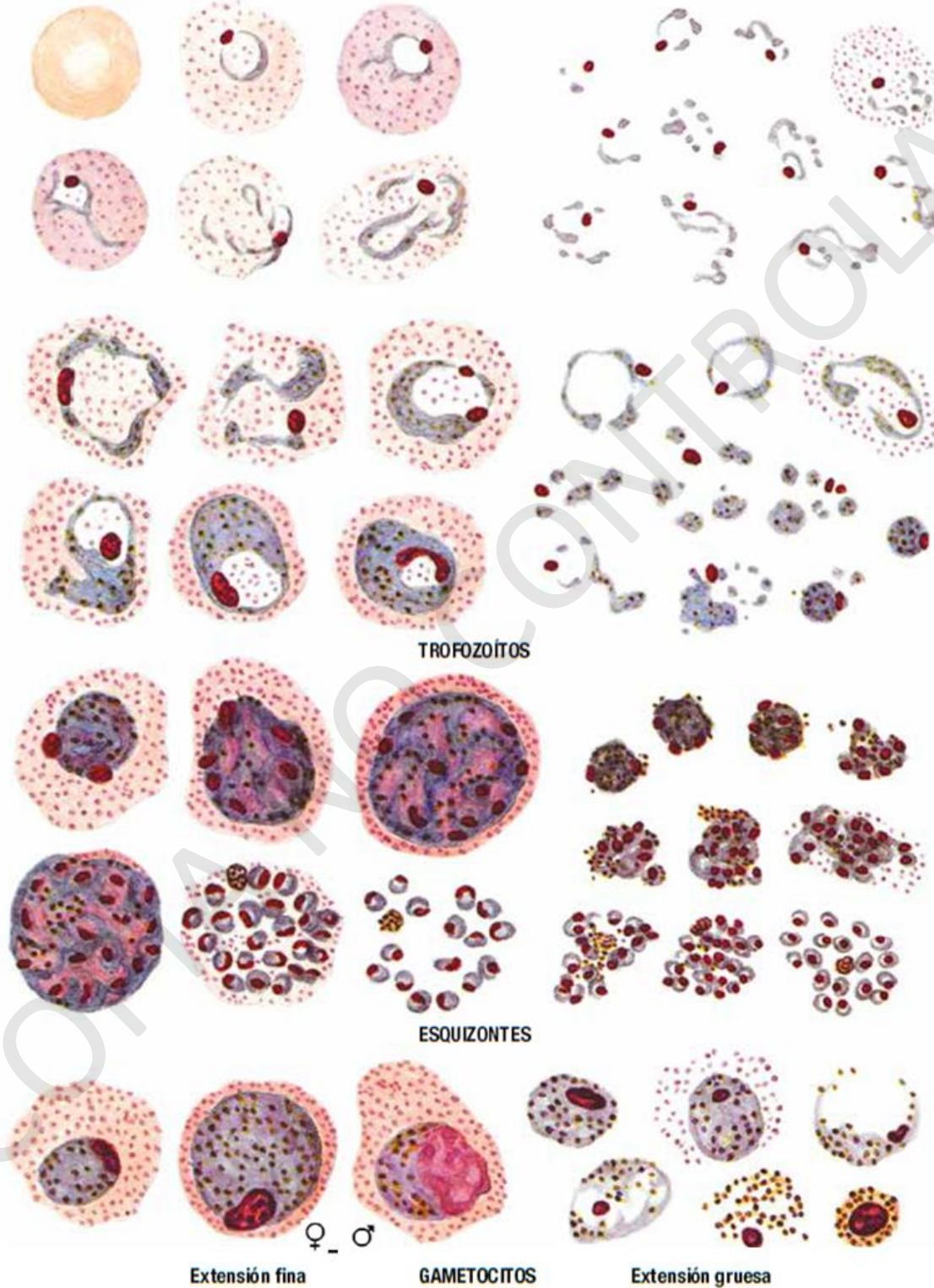
Efecto del pH en la morfología del parásito

pH 6.4 6.8 7.2 7.6



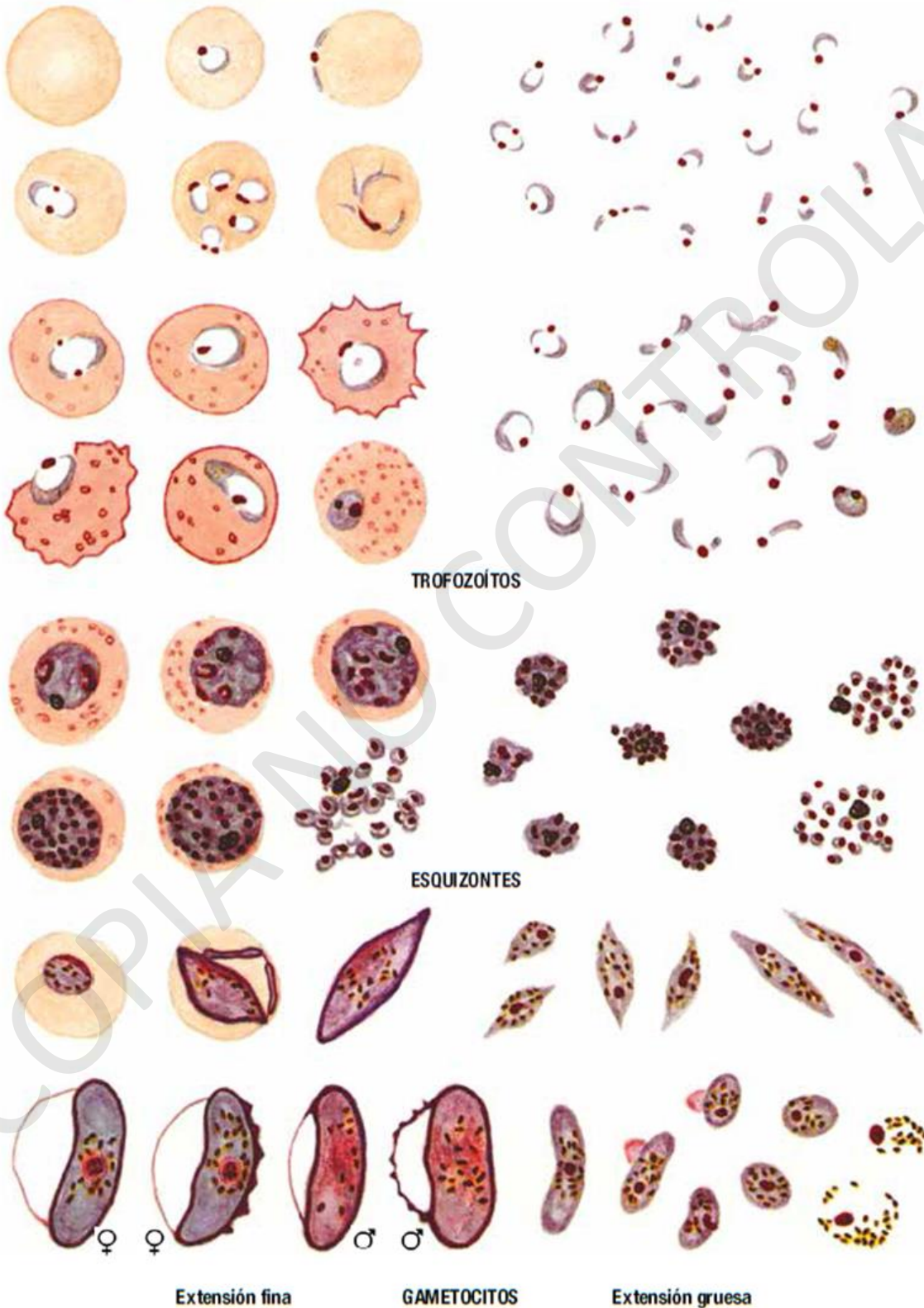
Diagnóstico laboratorial de paludismo

Fases de *Plasmodium vivax* en extensiones finas y gruesas teñidas con Giemsa



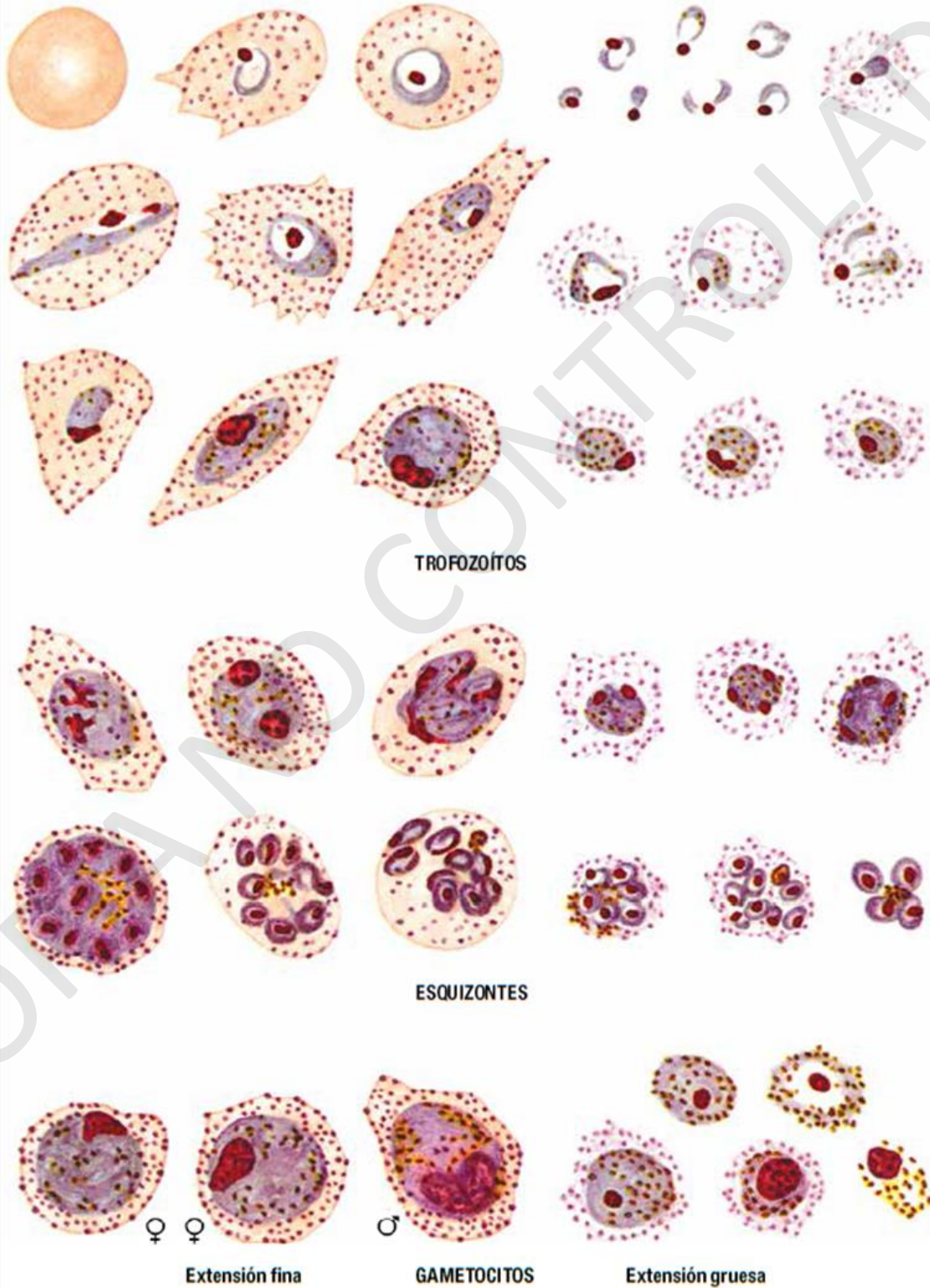
Diagnóstico laboratorial de paludismo

Fases de *Plasmodium falciparum* en extensiones finas y gruesas teñidas con Giemsa



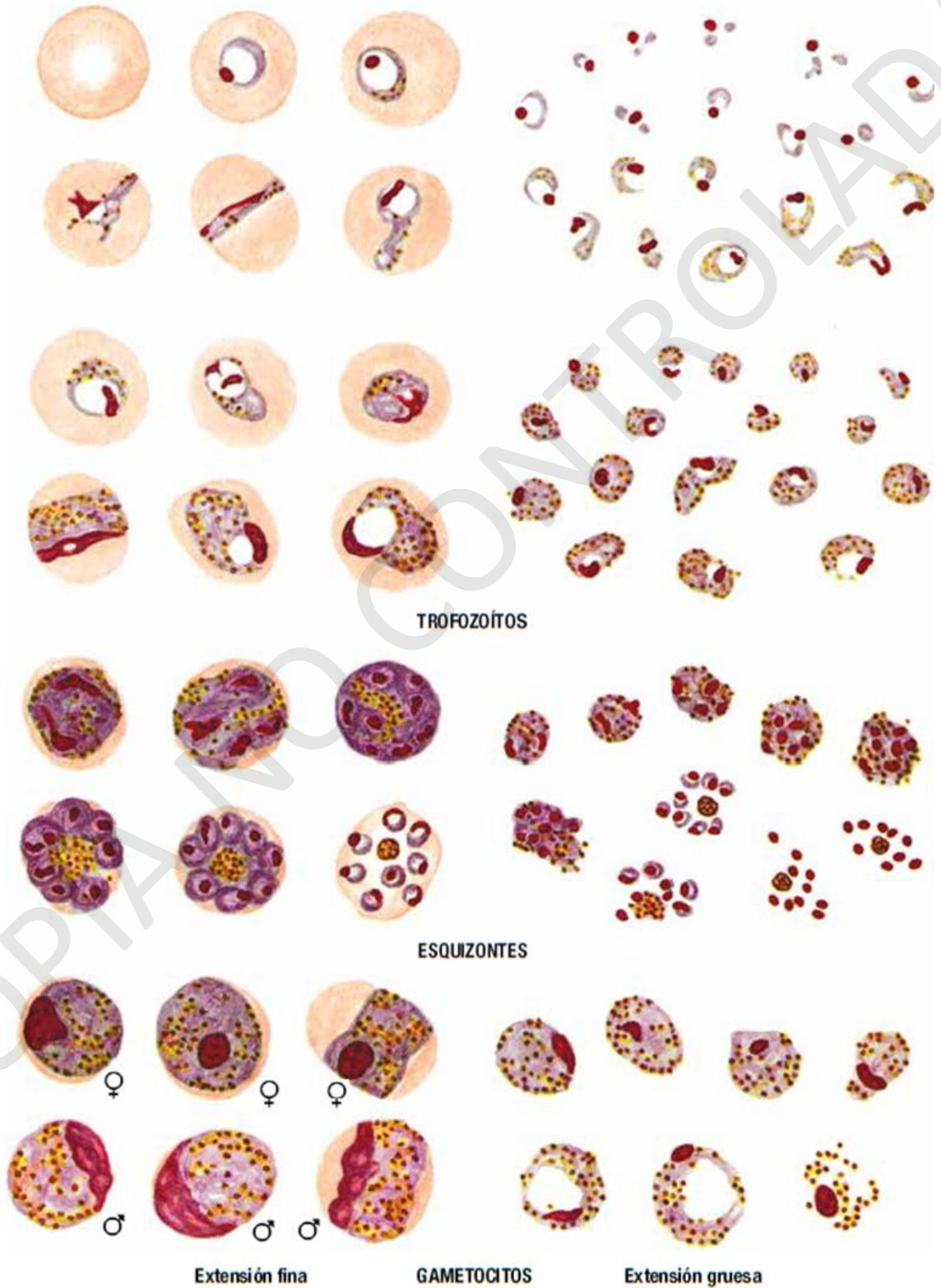
Diagnóstico laboratorial de paludismo

Fases de *Plasmodium ovale* en extensiones finas y gruesas teñidas con Giemsa



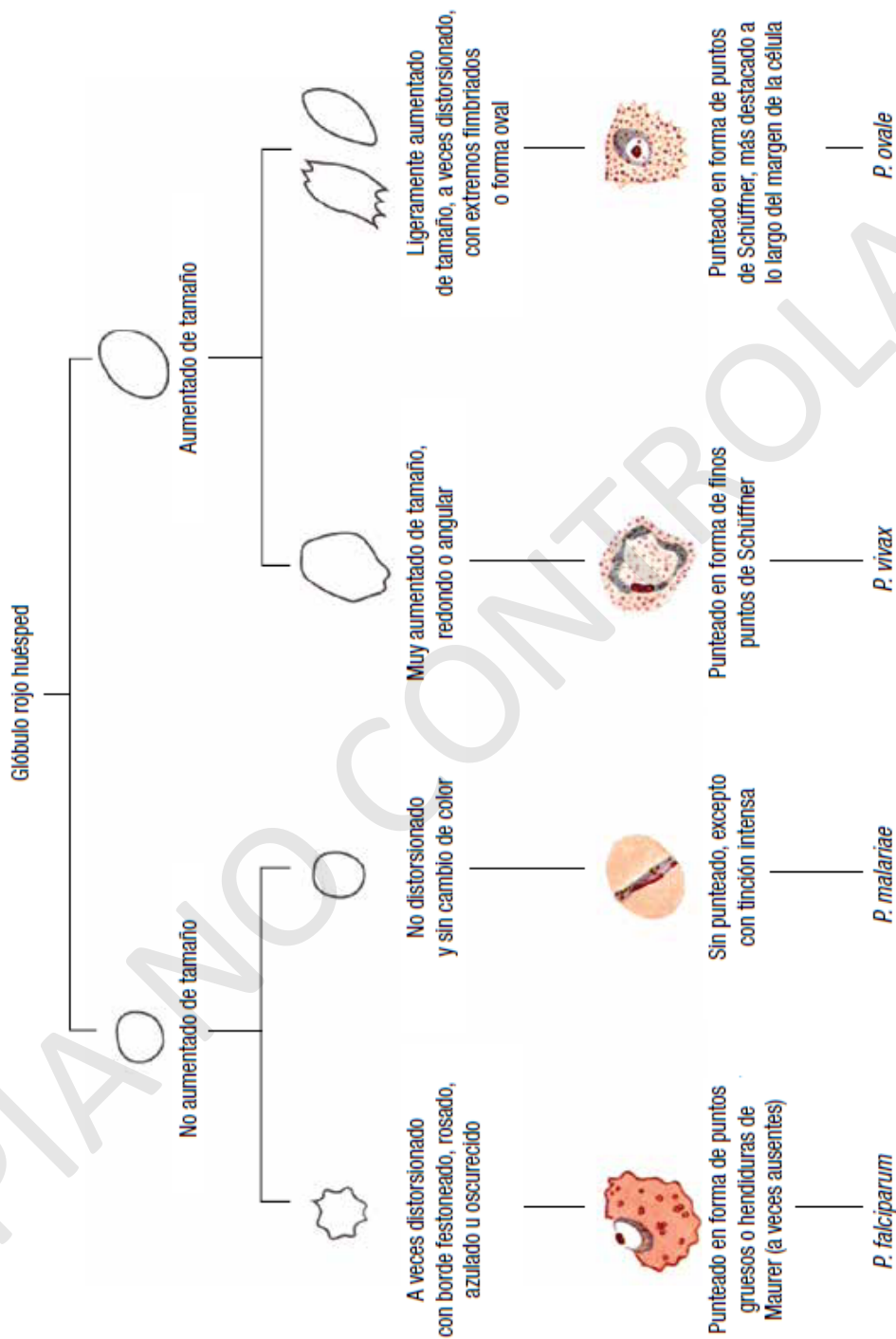
Diagnóstico laboratorial de paludismo

Fases de *Plasmodium malariae* en extensiones finas y gruesas teñidas con Giemsa



Diagnóstico laboratorial de paludismo

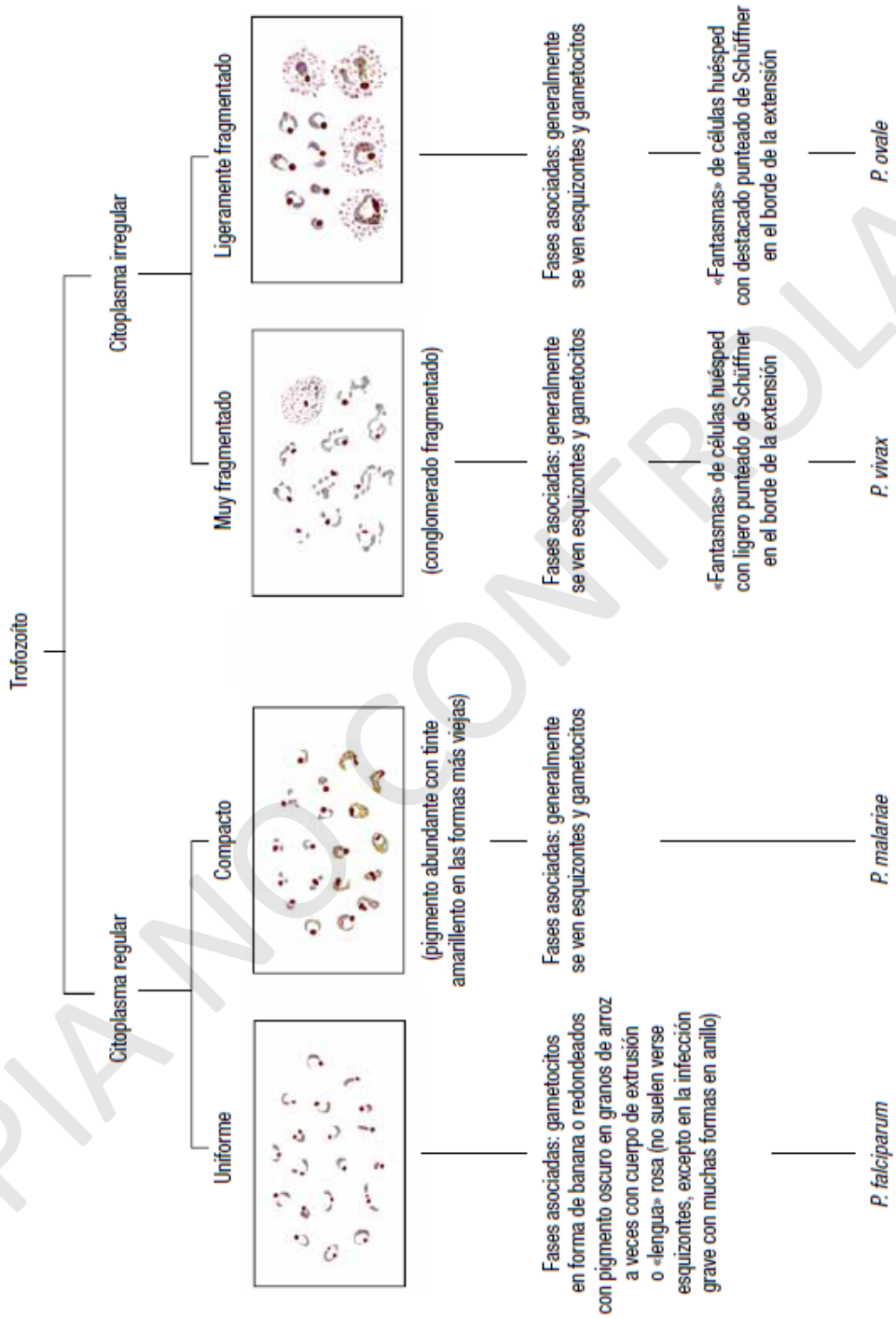
Diferenciación de las especies de plasmodios en las extensiones finas



Diferenciación de las especies de plasmodios en las extensiones finas basándose en los cambios de la célula y la presencia de punteado (tinción de Giemsa)

Diagnóstico laboratorial de paludismo

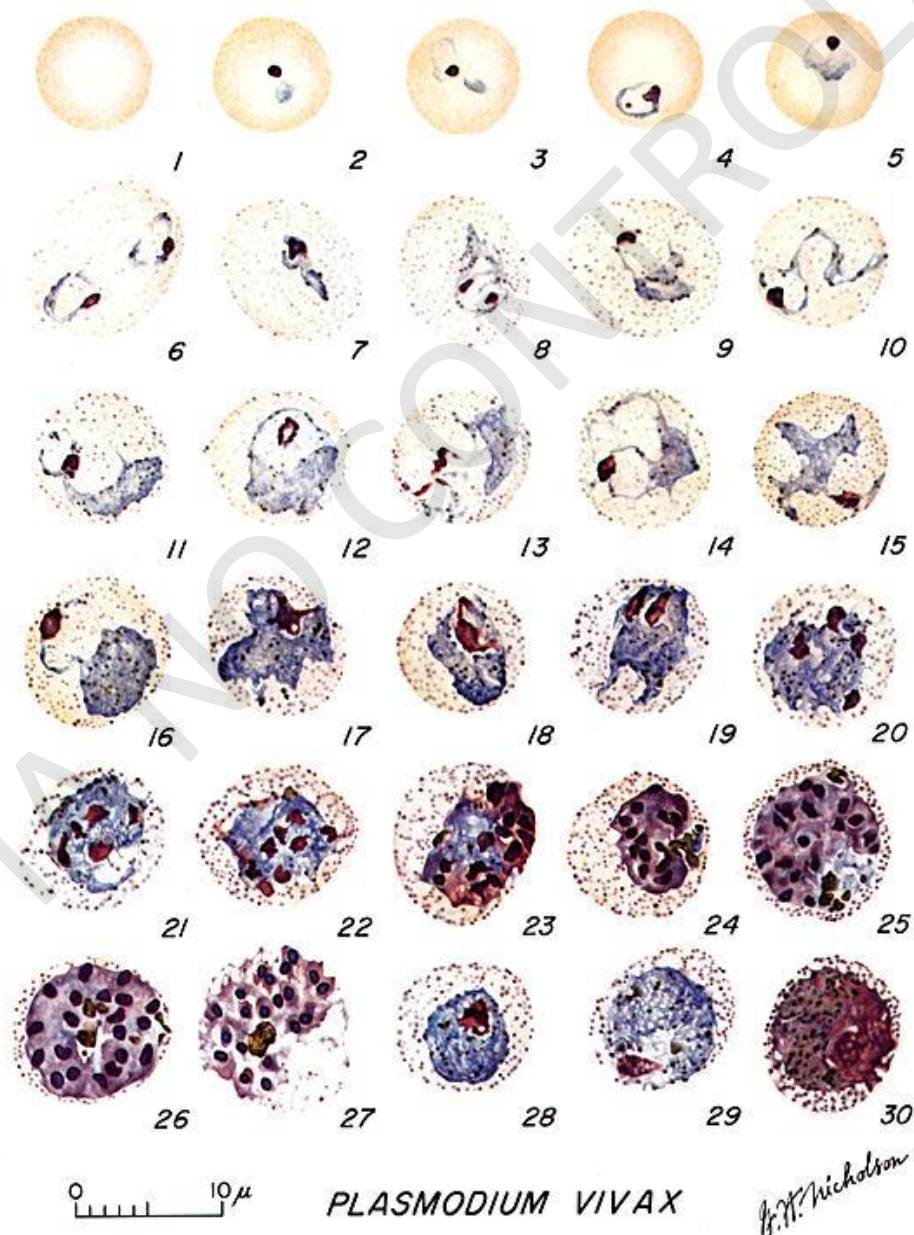
Diferenciación de las especies de plasmodios en las extensiones gruesas



Diferenciación de las especies de plasmodios en las extensiones gruesas basándose en las características del citoplasma y el punteado de los trofozoitos (tinción de Giemsa)

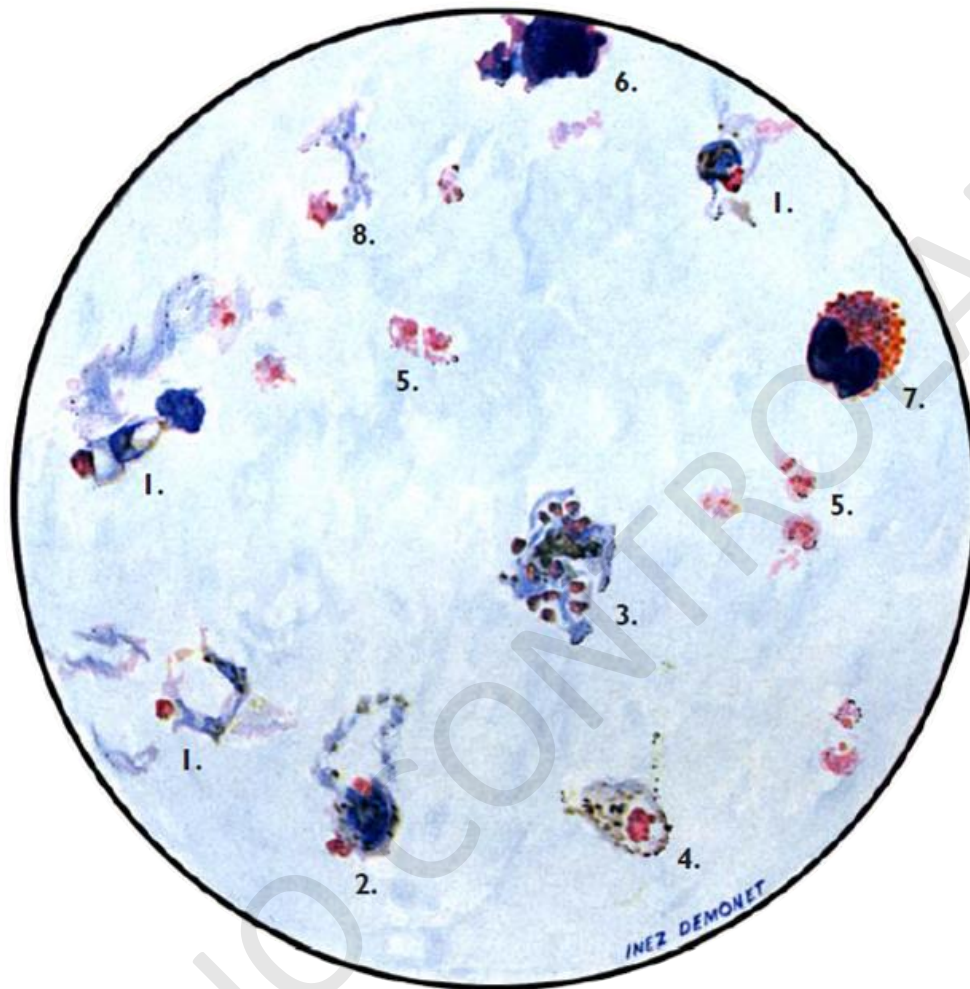
19.2. GRÁFICOS AUXILIARES DE CDC PARA DIAGNÓSTICO DE PALUDISMO

19.2.1. *Plasmodium vivax*



Desarrollo de las etapas eritrocíticas de *Plasmodium vivax* en extendido hemático. 1, glóbulo rojo normal; 2 a 6, trofozoítos jóvenes; 7 a 18, trofozoítos maduros; 19 a 24, esquizontes jóvenes; 25 a 27, esquizontes maduros; 28 y 29, macrogametocito maduro; 30, microgametocito maduro.

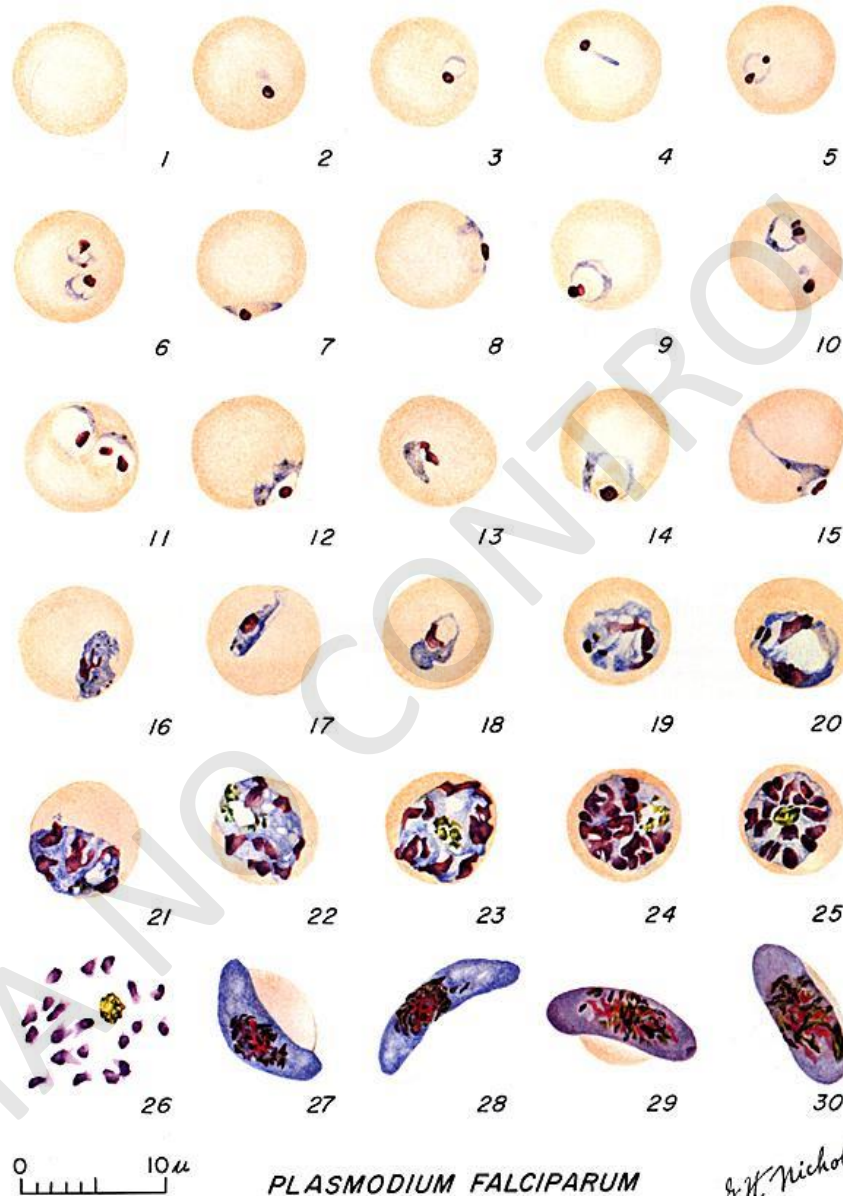
Diagnóstico laboratorial de paludismo



Etapas eritrocíticas de *Plasmodium vivax* en gota gruesa. 1, trofozoítos ameboides; 2, esquizonte joven; 3, esquizonte maduro; 4, microgametocito; 5, plaquetas; 6, núcleo de neutrófilo; 7, eosinófilo; 8, plaquetas con restos celulares de eritrocitos.

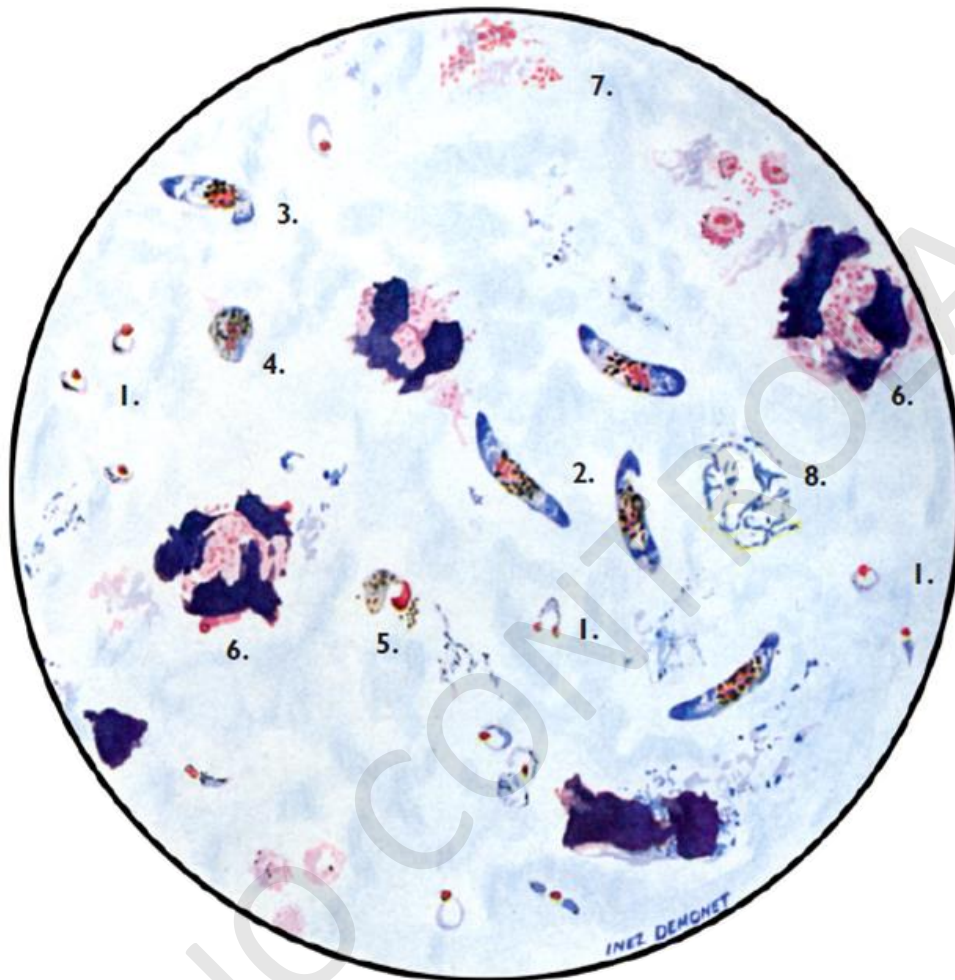
Diagnóstico laboratorial de paludismo

19.2.2. *Plasmodium falciparum*



Desarrollo de las etapas eritrocíticas de *Plasmodium falciparum* en extendido hemático. 1, glóbulo rojo normal; 2 a 10, trofozoítos jóvenes; 11 a 18, trofozoítos maduros; 19 a 23, esquizontes jóvenes; 24 a 26, esquizontes maduros; 27 y 28, macrogametocito maduro; 29 y 30, microgametocito maduro.

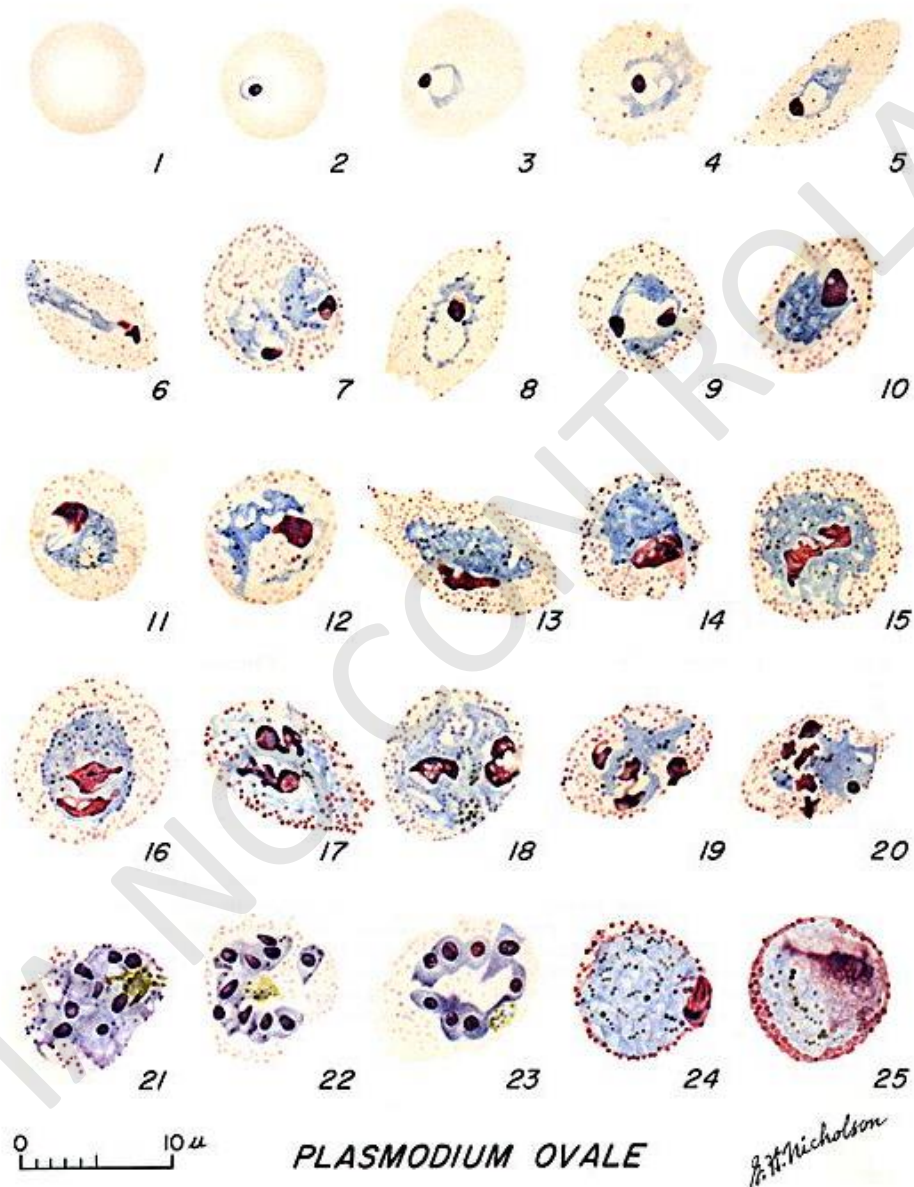
Diagnóstico laboratorial de paludismo



Etapas eritrocíticas de *Plasmodium falciparum* en gota gruesa. 1, trofozoíto; 2, gametocito normal; 3, gametocito levemente distorsionado; 4, gametocito redondeado; 5, gametocito desintegrado; 6, núcleo de leucocito; 7, plaquetas; 8, restos celulares de eritrocito.

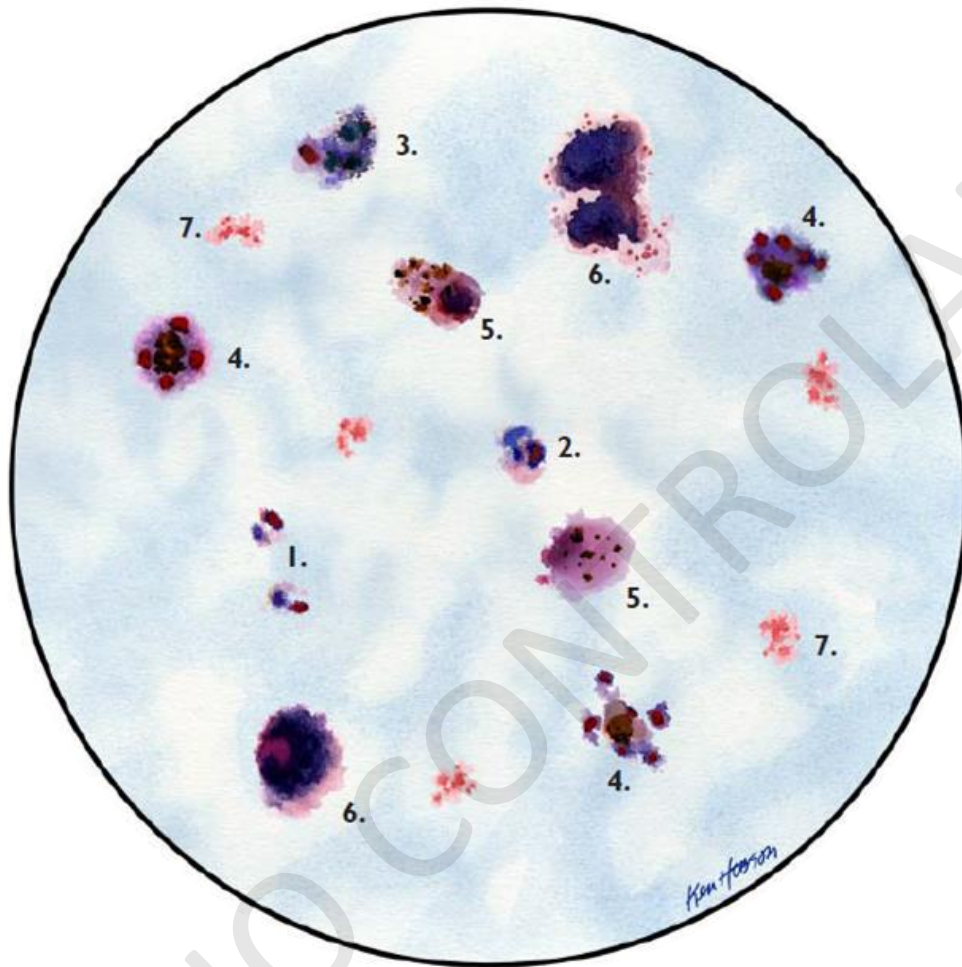
Diagnóstico laboratorial de paludismo

19.2.3. *Plasmodium ovale*



Desarrollo de las etapas eritrocíticas de *Plasmodium ovale* en extendido hemático. 1, glóbulo rojo normal; 2 a 5, trofozoítos jóvenes; 6 a 15, trofozoítos maduros; 16 a 20, esquizontes jóvenes; 21 a 23, esquizontes maduros; 24, macrogametocito maduro; 25, microgametocito maduro.

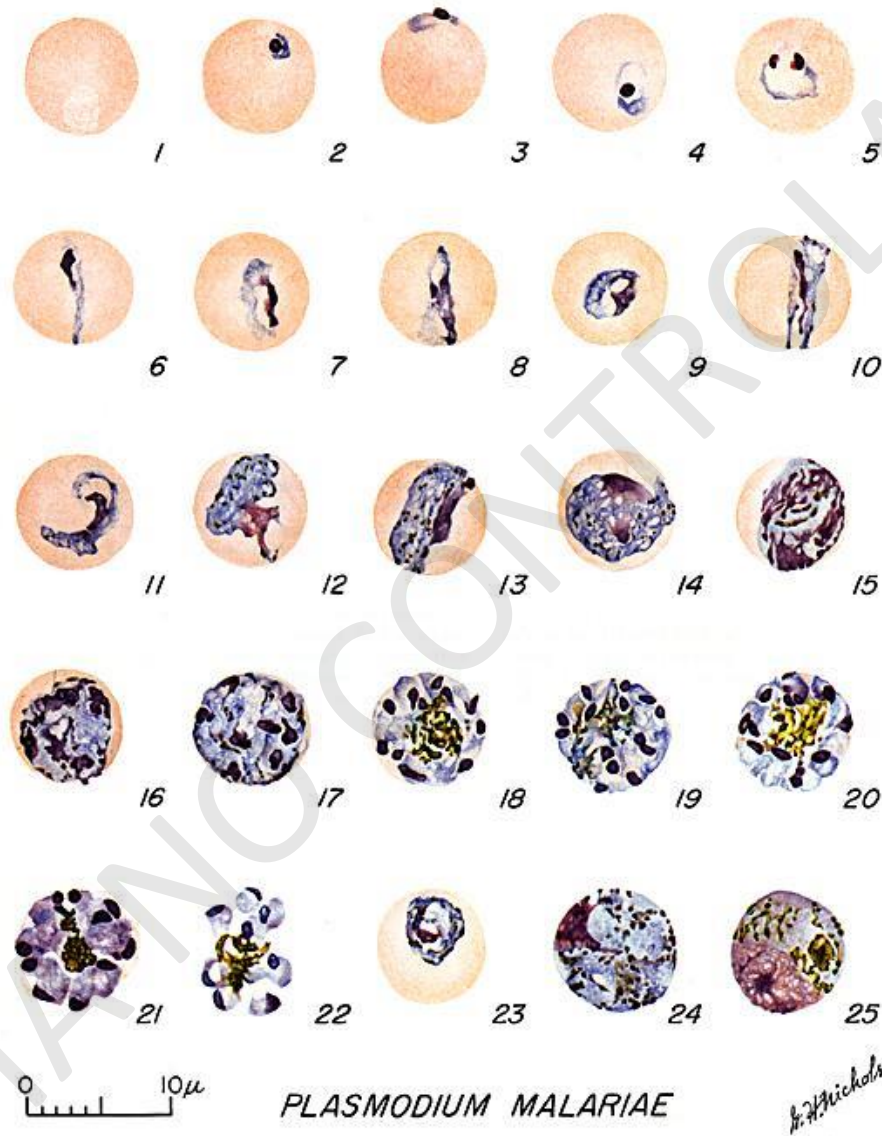
Diagnóstico laboratorial de paludismo



Etapas eritrocíticas de *Plasmodium ovale* en gota gruesa. 1, trofozoítos jóvenes; 2, trofozoítos en desarrollo; 3, trofozoítos maduros; 4, esquizontes; 5, gametocitos; 6, núcleo de leucocito; 7, plaquetas.

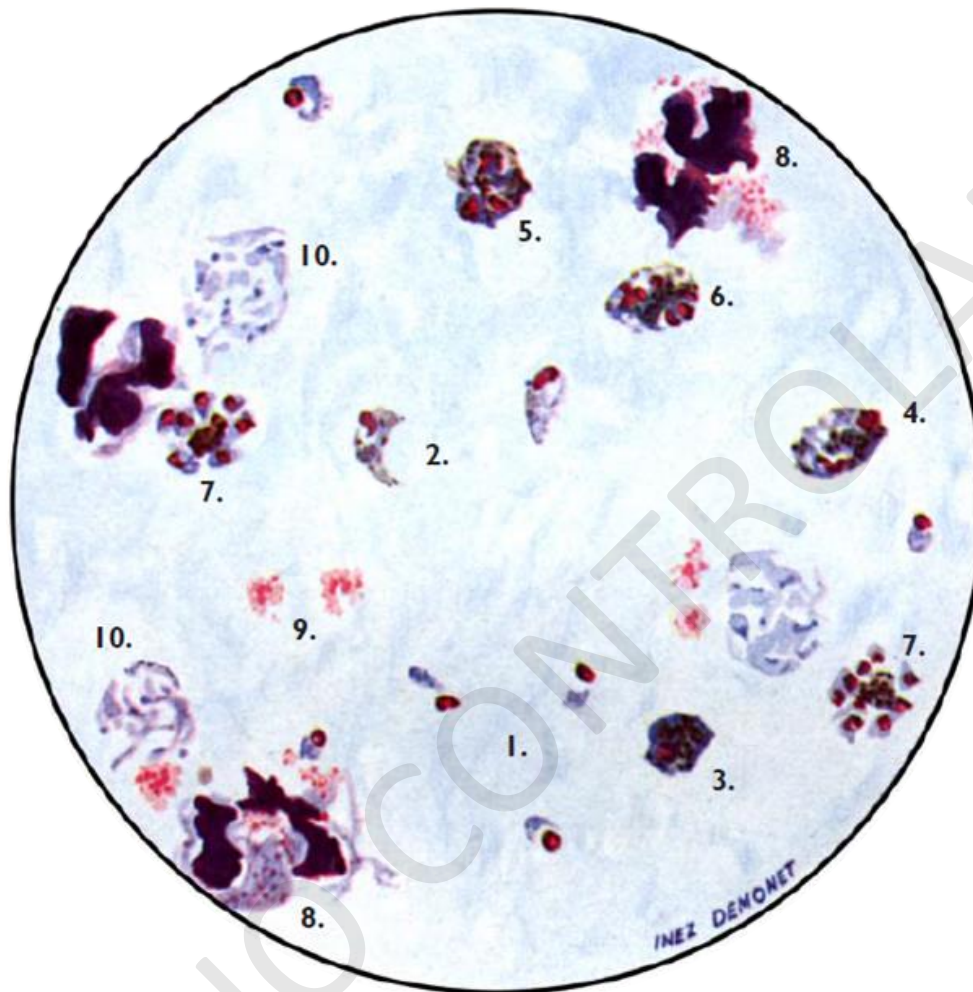
Diagnóstico laboratorial de paludismo

19.2.4. *Plasmodium malariae*



Desarrollo de las etapas eritrocíticas de *Plasmodium malariae* en extendido hemático. 1, glóbulo rojo normal; 2 a 5, trofozoítos jóvenes; 6 a 13, trofozoítos maduros; 14 a 20, esquizontes jóvenes; 21 y 22, esquizontes maduros; 23, gametocito en desarrollo; 24, macrogametocito maduro; 25, microgametocito maduro.

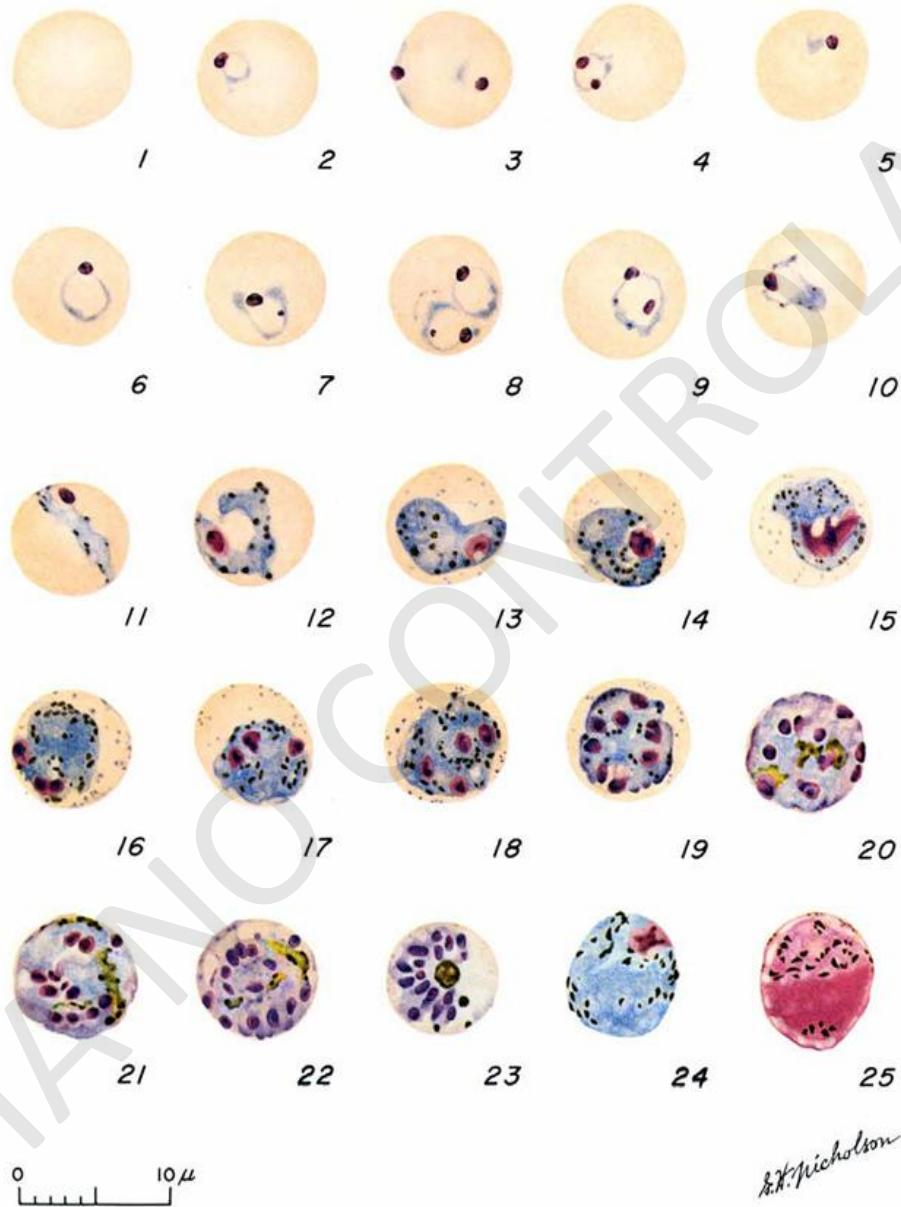
Diagnóstico laboratorial de paludismo



Etapas eritrocíticas de *Plasmodium malariae* en gota gruesa. 1, trofozoítos jóvenes; 2, trofozoítos en desarrollo; 3, trofozoítos maduros; 4, 5, 6, esquizontes jóvenes; 7, esquizontes maduros; 8, núcleo de leucocito; 9, plaquetas; 10, restos celulares de eritrocito.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

19.2.5. *Plasmodium knowlesi*



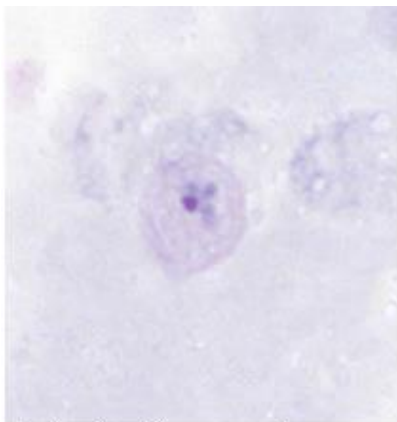
PLASMODIUM KNOWLESI

Desarrollo de las etapas eritrocíticas de *Plasmodium knowlesi* en extendido hemático. 1, glóbulo rojo normal; 2 a 6, trofozoítos jóvenes; 7 a 14, trofozoítos maduros; 15 a 18, esquizontes jóvenes; 19 a 23, esquizontes maduros; 23, gametocito en desarrollo; 24, macrogametocito maduro; 25, microgametocito maduro.

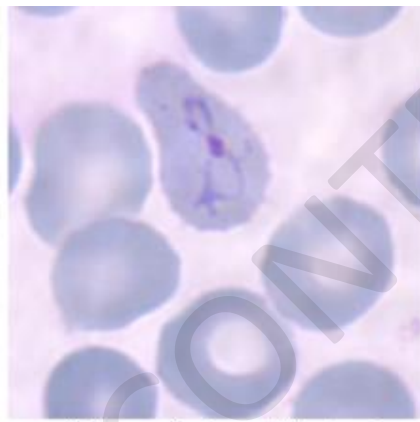
19.3. LÁMINAS FOTOGRÁFICAS AUXILIARES DE CDC PARA DIAGNÓSTICO DE PALUDISMO

19.3.1. *Plasmodium vivax*

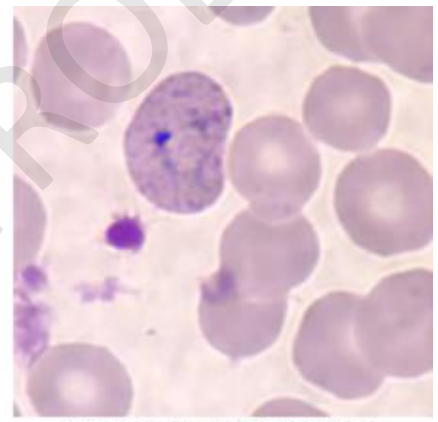
Trofozoítos jóvenes



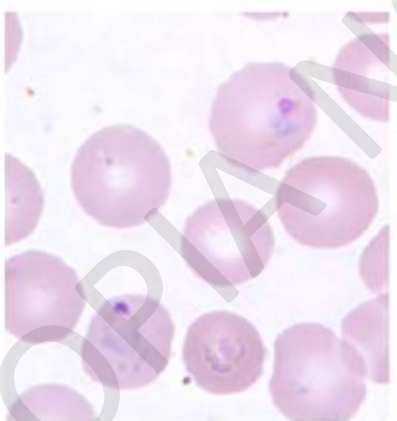
Trofozoítos jóvenes en gota gruesa. El halo sugiere granulaciones de Schüffner.



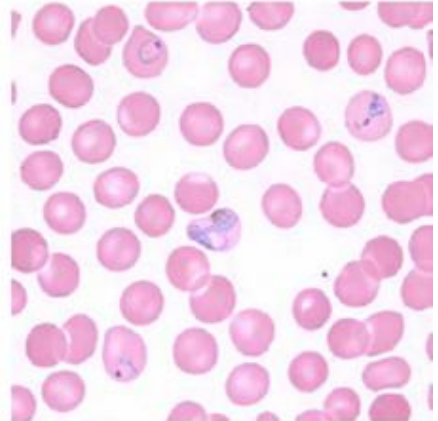
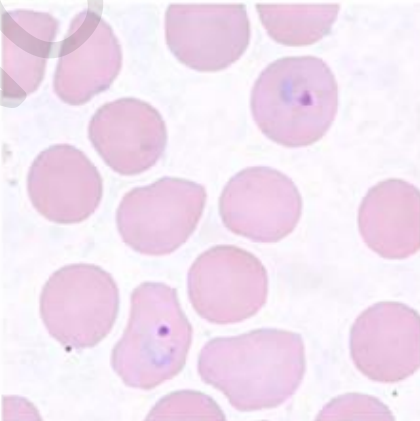
Anillo ameboide en glóbulo rojo agrandado y distorsionado.



Anillo en eritrocito agrandado y distorsionado. Se observan granulaciones de Schüffner.



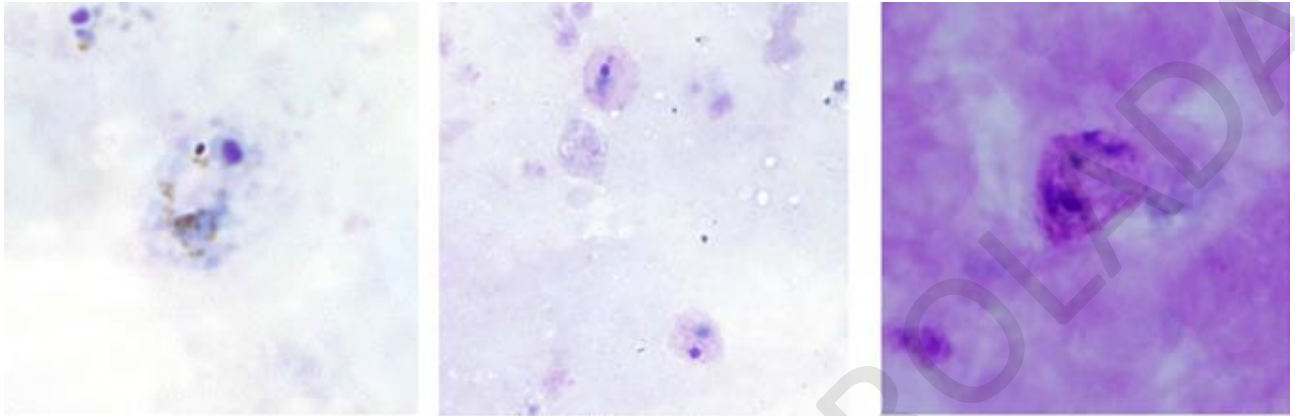
Trofozoítos jóvenes en extendido hemático. Se observa agrandamiento de glóbulos rojos.



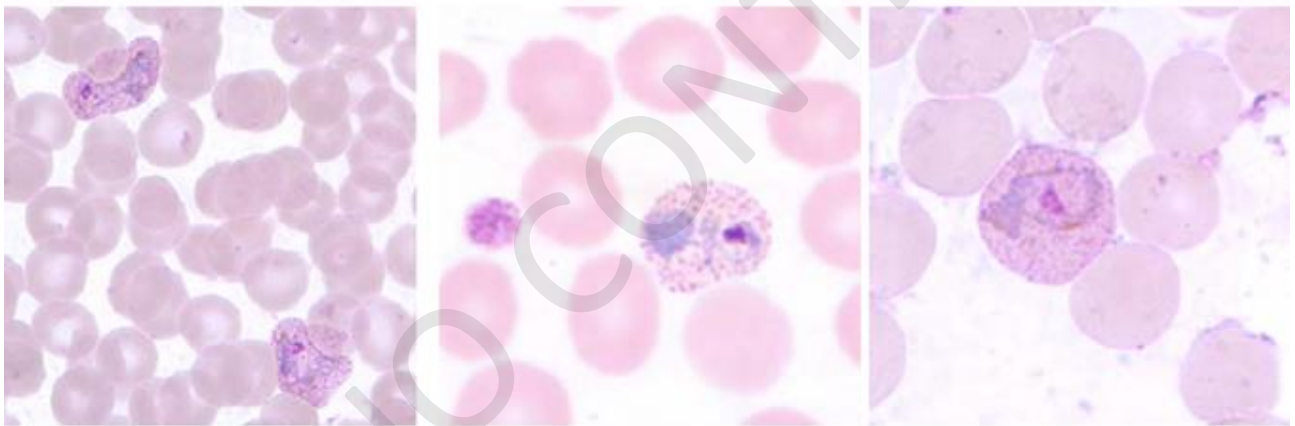
Trofozoíto joven y trofozoíto maduro en extendido hemático.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

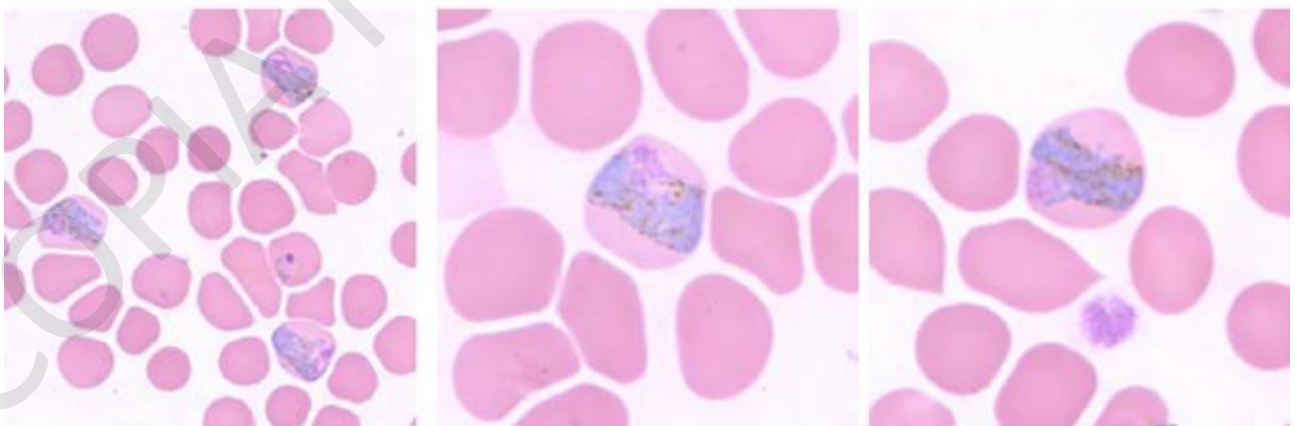
Trofozoítos maduros



Trofozoitos en gota gruesa.



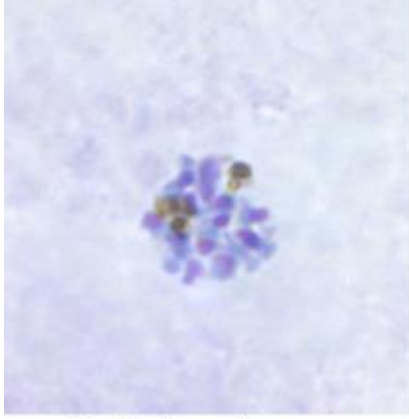
Trofozoítos grandes, ameboides, en extendido hemático, con presencia de granulaciones de Schüffner.



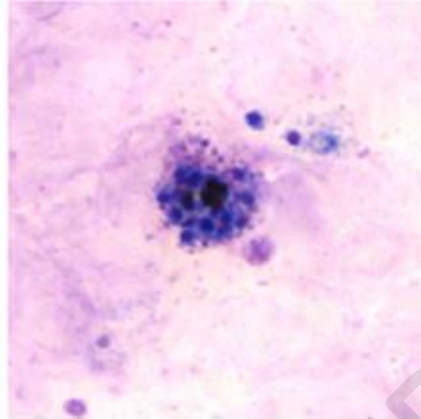
Trofozoítos maduros en extendido hemático, en forma de bandas ecuatoriales que asemejan a *P. malariae*.
El agrandamiento de los glóbulos rojos distingue ambas especies.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

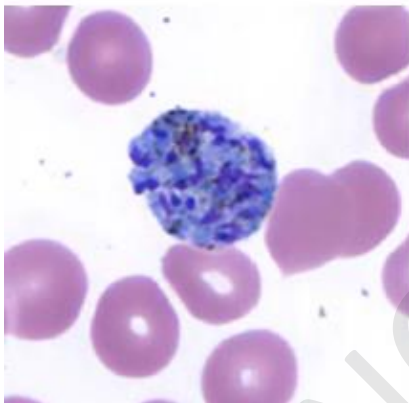
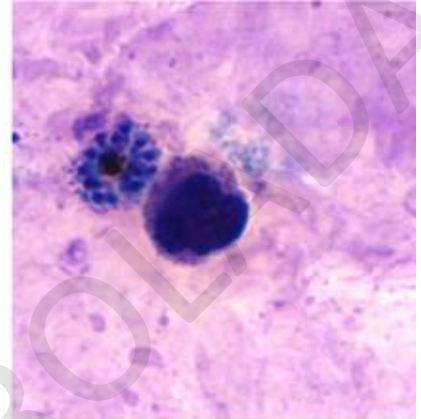
Esquizontes



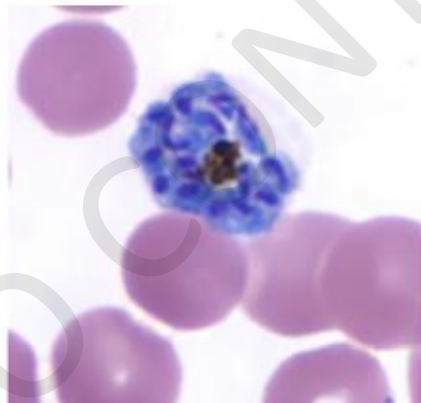
Esquizonte en gota gruesa.



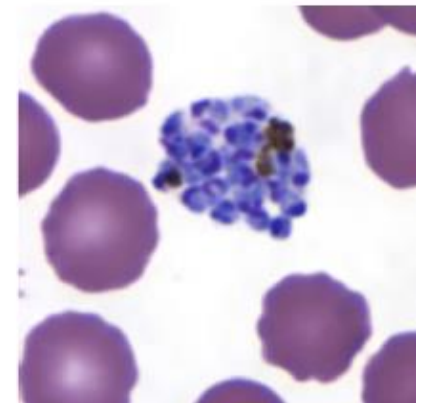
Esquizontes en extendido hemático.



Esquizonte joven en extendido hemático.

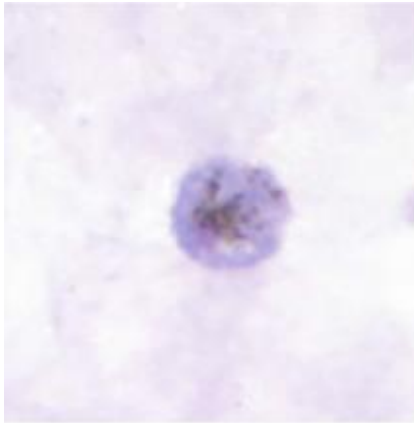


Esquizontes maduros en extendido hemático.

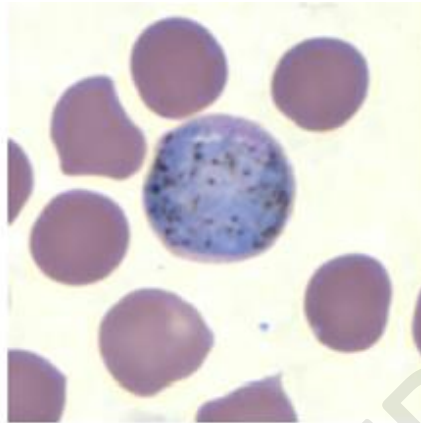


Diagnóstico laboratorial de paludismo

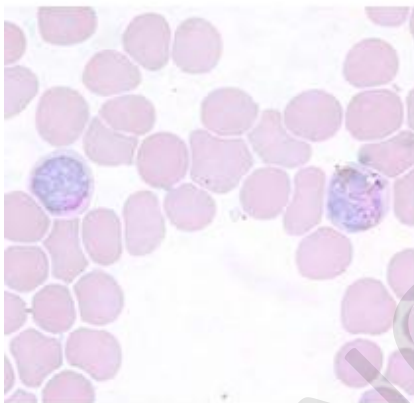
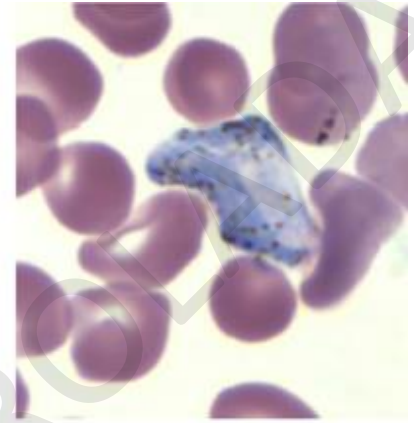
Gametocitos



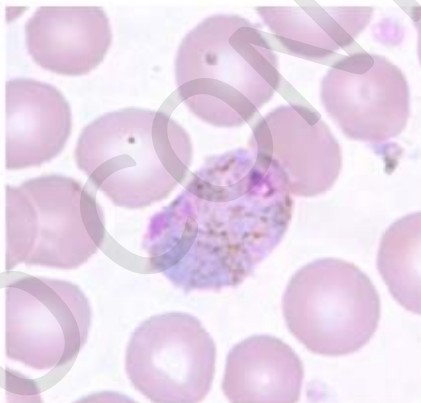
Gametocito en gota gruesa.



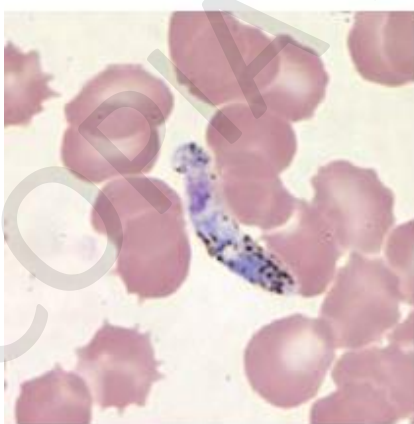
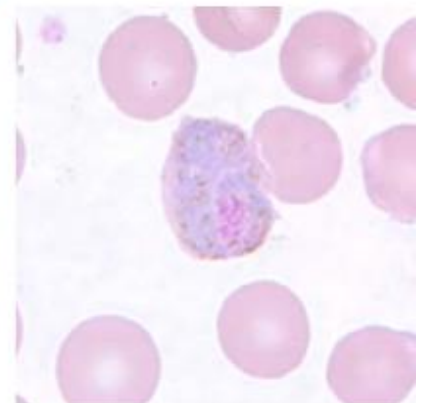
Gametocitos en extendido hemático.



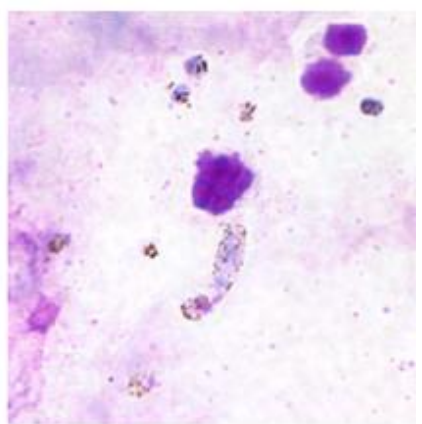
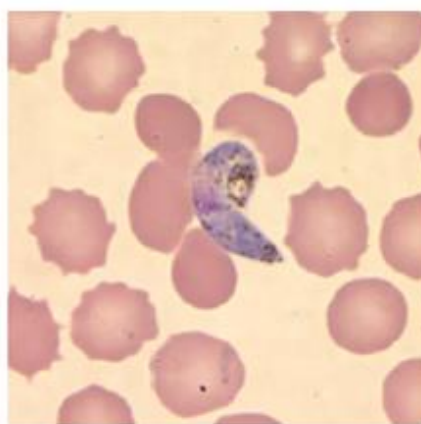
Gametocitos en extendido hemático.



Gametocitos en extendido hemático. Se observa agrandamiento de glóbulo rojo y pigmento disperso.



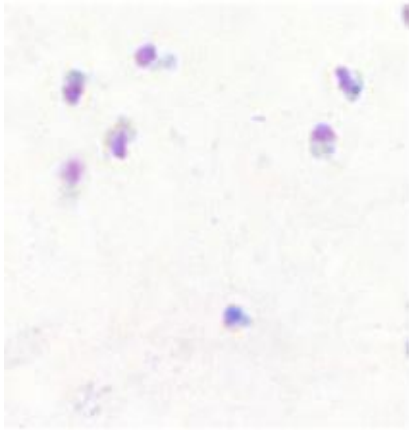
Ooquinetos en extendido hemático. Los ooquinetos puede formarse si la sangre se deja reposar demasiado tiempo antes del procesamiento.



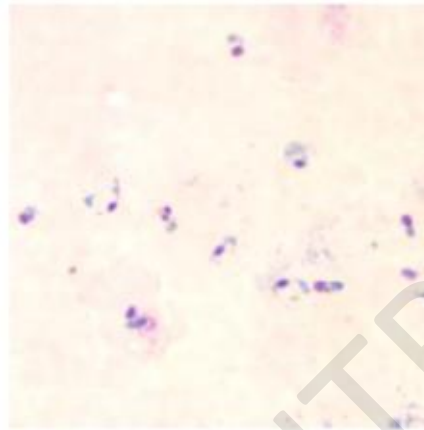
Ooquinetos en gota gruesa.

19.3.2. *Plasmodium falciparum*

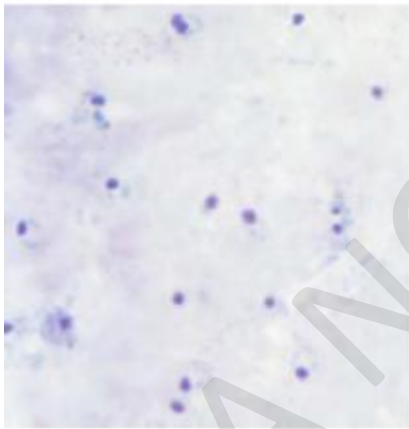
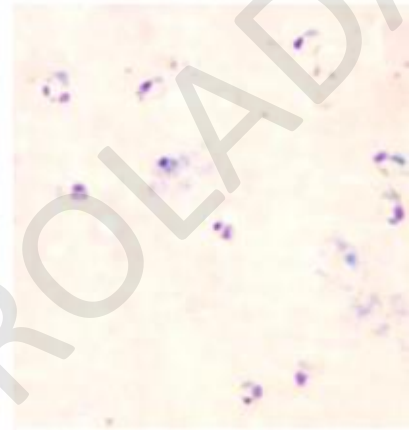
Trofozoítos jóvenes



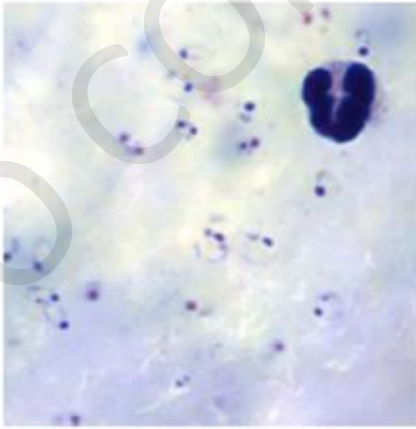
Trofozoítos jóvenes en
gota gruesa.



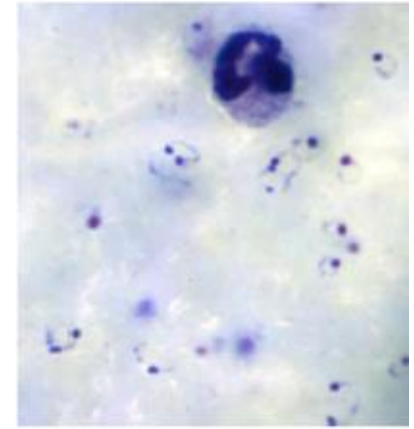
Trofozoítos jóvenes en gota gruesa.



Trofozoítos jóvenes en
gota gruesa.

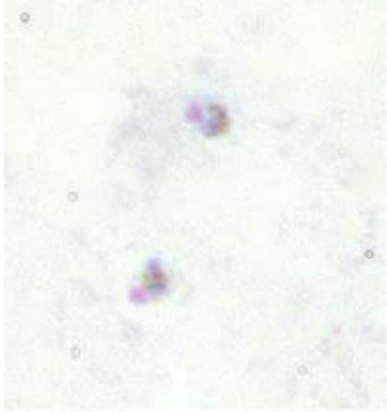


Trofozoítos jóvenes en gota gruesa. Se observan formas en herradura.

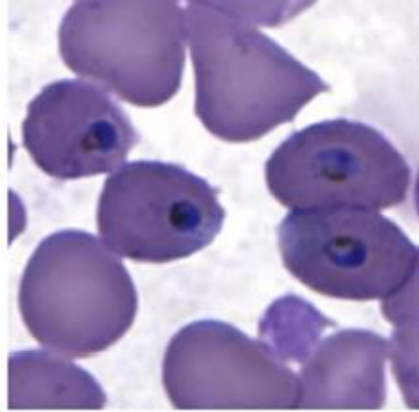


Diagnóstico laboratorial de paludismo

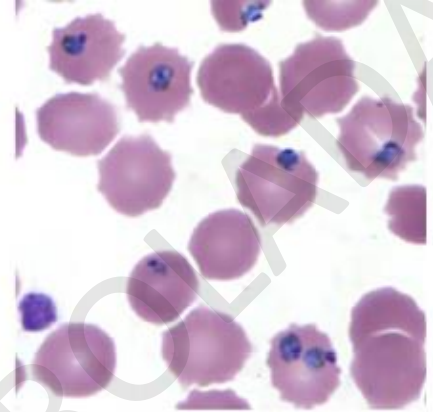
Trofozoítos maduros (se observan raramente en sangre periférica)



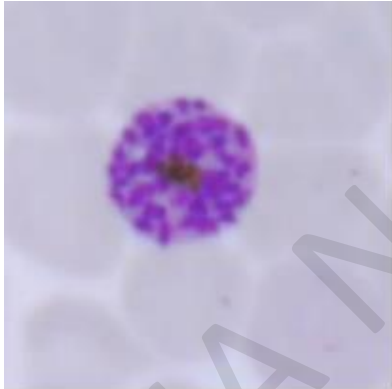
Trofozoítos maduros en
gota gruesa.



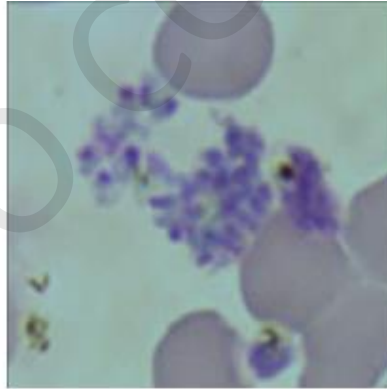
Trofozoítos maduros en extendido hemático.



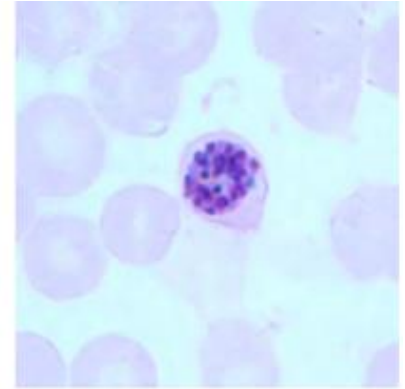
Esquizontes (se observan raramente en sangre periférica)



Esquizonte maduro en
gota gruesa.



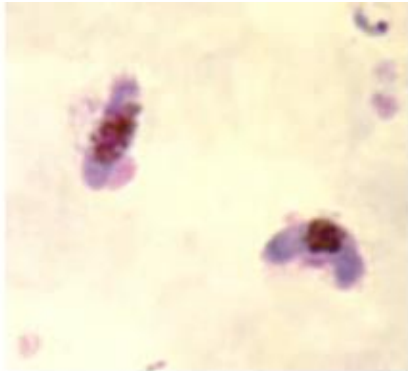
Esquizonte roto en extendido
hemático.



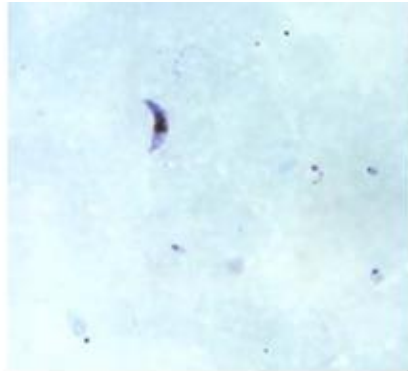
Esquizonte maduro en
extendido hemático.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

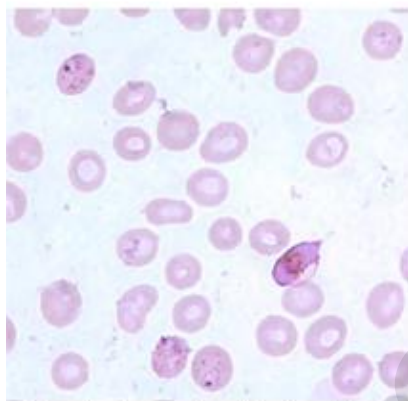
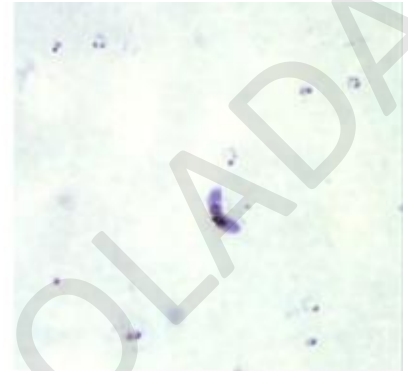
Gametocitos



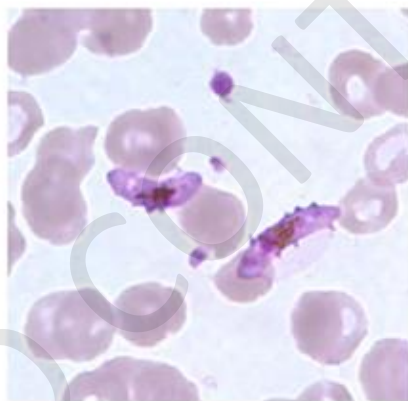
Gametocitos en gota gruesa.



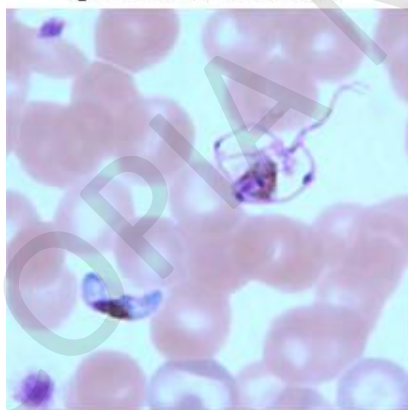
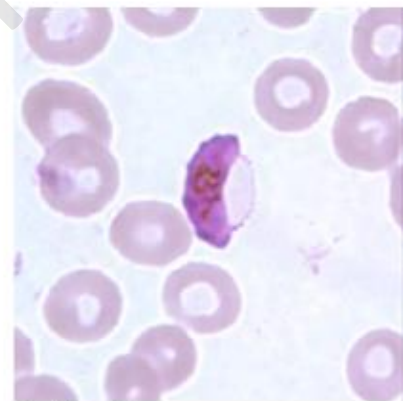
Gametocitos y trofozoitos en gota gruesa.



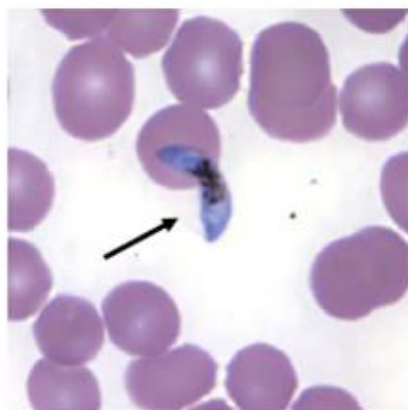
Gametocito en extendido hemático.
Se observa también trofozoitos con
granulaciones de Maurer.



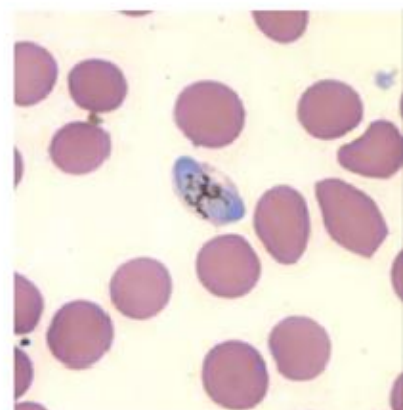
Gametocitos en extendido hemático.



Gametocitos en extendido hemático.
Se observa uno en exflagelación.

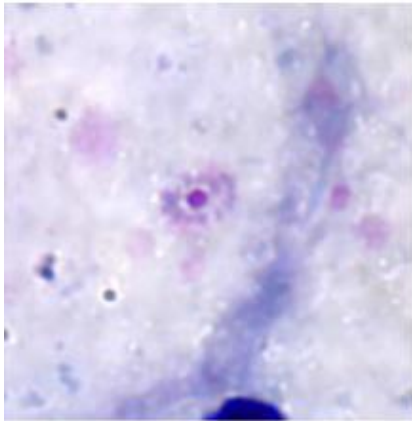


Gametocitos en extendido hemático. Se observa la presencia de "babero de Laveran" (flecha) no siempre visible.

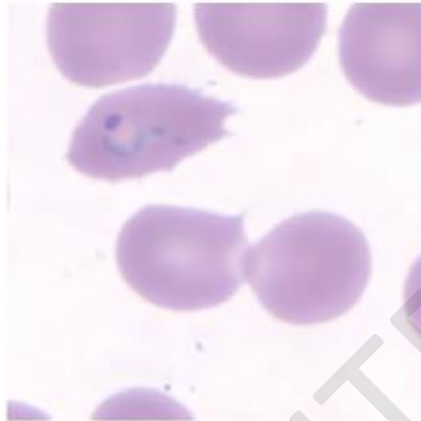


19.3.3. *Plasmodium ovale*

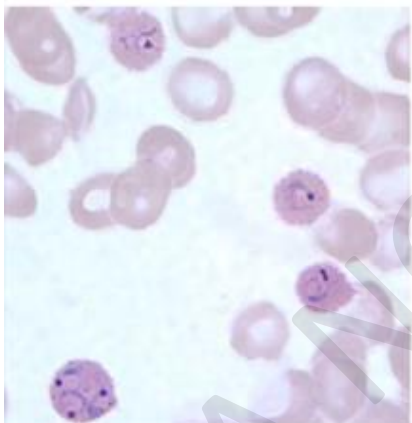
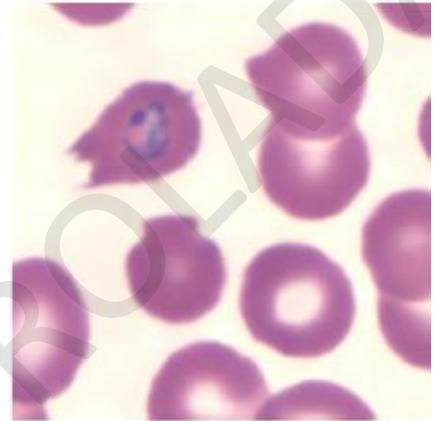
Trofozoítos jóvenes



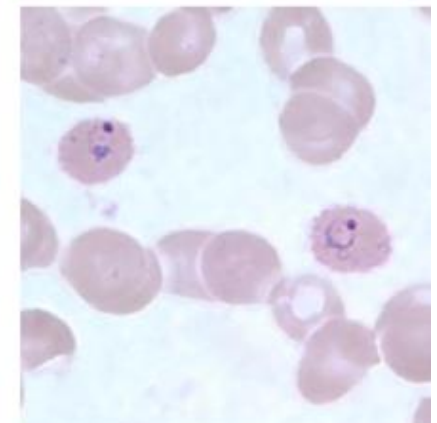
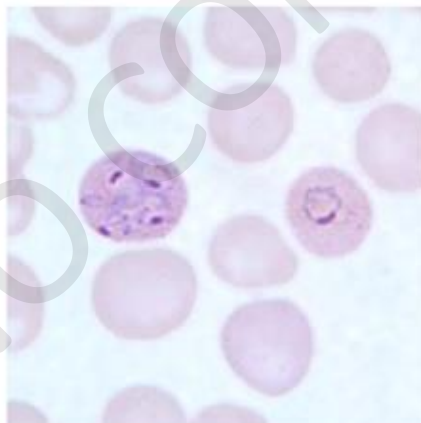
Trofozoítos jóvenes en gota gruesa.



Trofozoítos jóvenes en eritrocitos desfleados en extendido hemático.



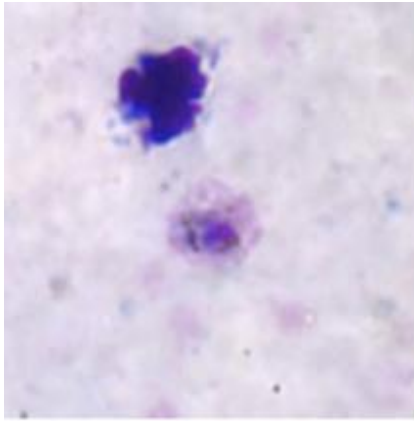
Trofozoítos jóvenes en extendido hemático. Se observan glóbulos rojos multiparasitados.



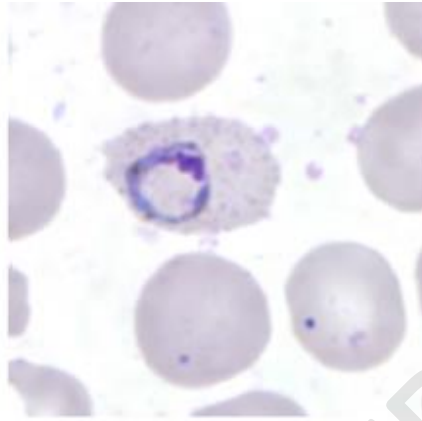
Trofozoítos jóvenes en extendido hemático.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

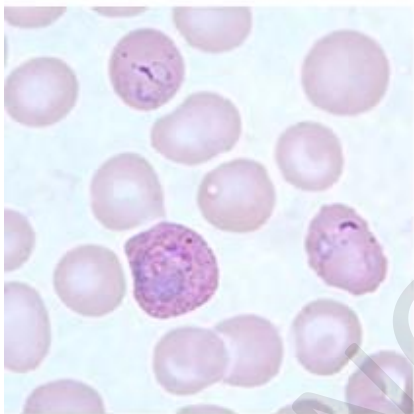
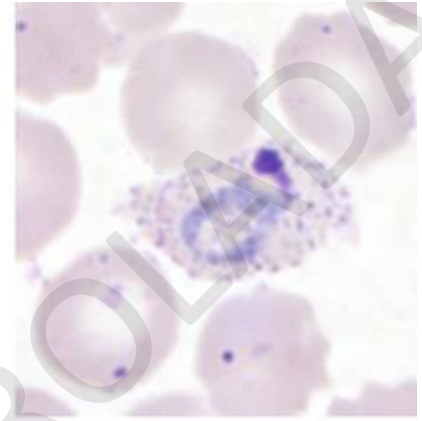
Trofozoítos maduros



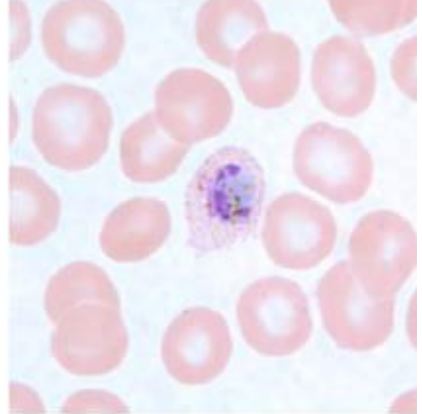
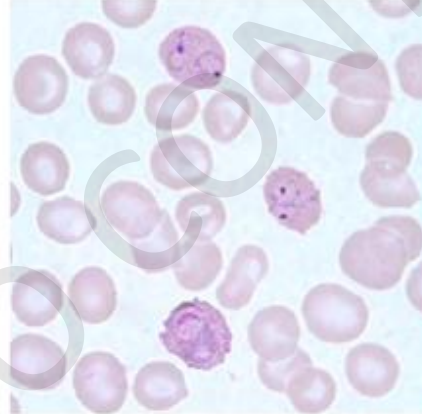
Trofozoíto en gota gruesa.



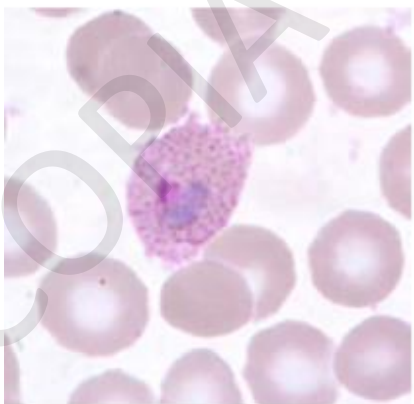
Trofozoítos maduros en eritrocito desflechado en extendido hemático. Se observan granulaciones de Schuffner.



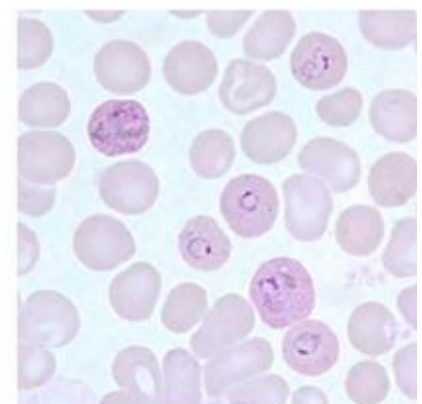
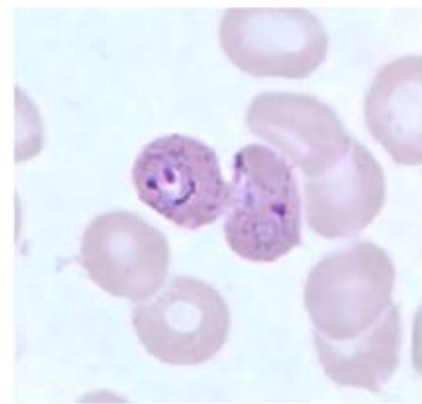
Trofozoítos en desarrollo en extendido hemático.



Trofozoíto maduro en eritrocito desflechado en extendido hemático.



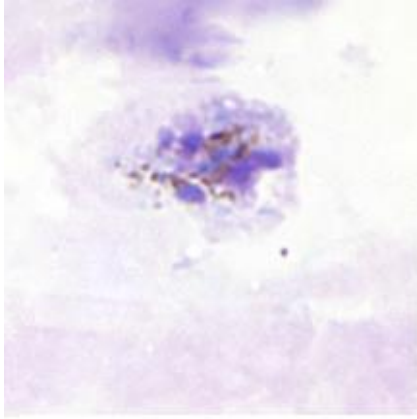
Trofozoítos maduros en extendido hemático. Se observan granulaciones de Schuffner.



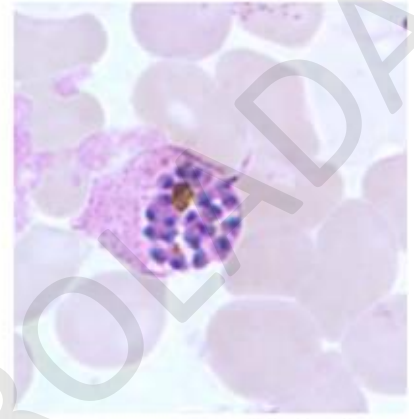
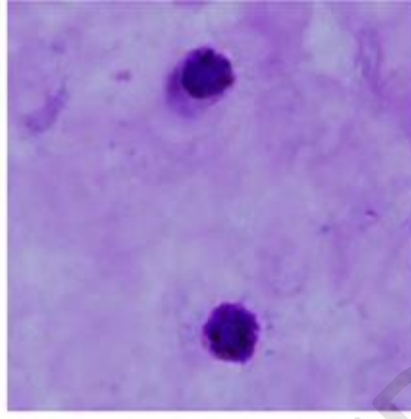
Trofozoítos jóvenes, en desarrollo y maduros en extendido hemático.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

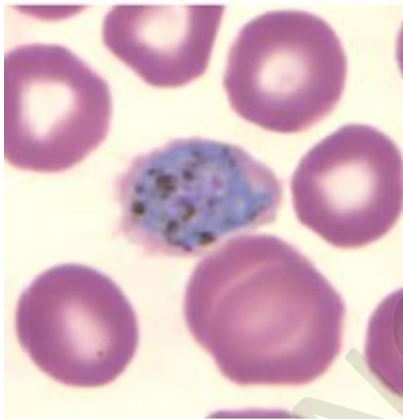
Esquizontes



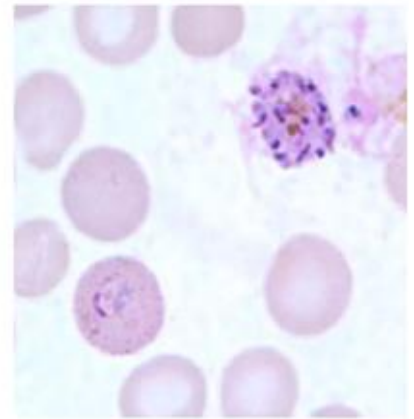
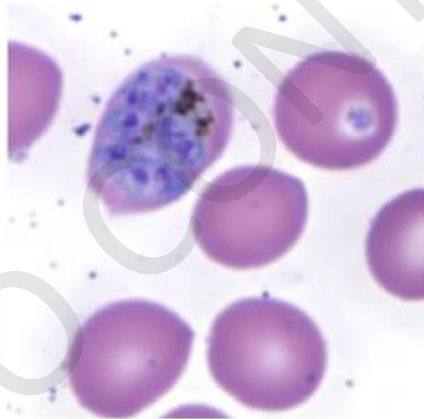
Esquizontes en gota gruesa.



Esquizontes en extendido hemático.



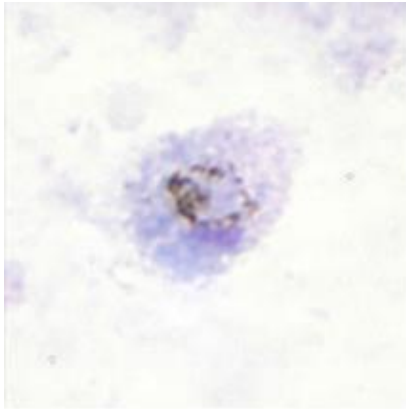
Esquizontes en extendido hemático. Se observan glóbulos rojos alargados.



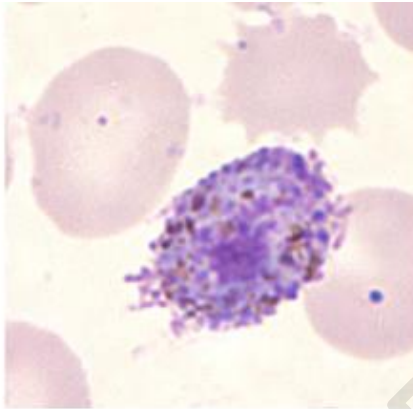
Esquizonte y trofozoito en extendido hemático.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

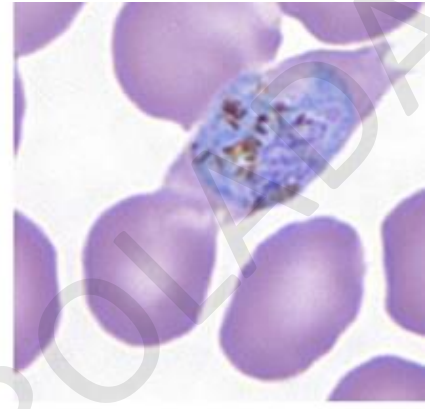
Gametocitos



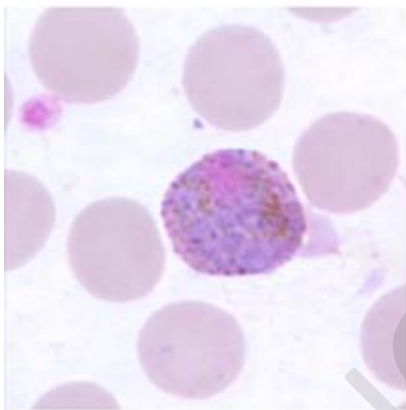
Gametocito en gota gruesa.



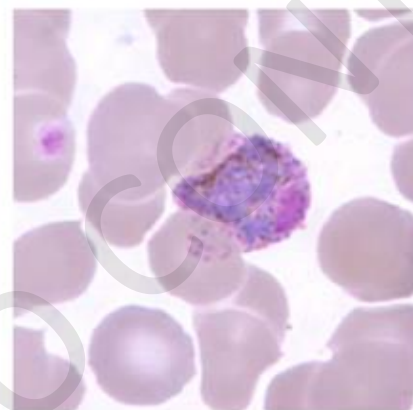
Gametocito en extendido hemático.



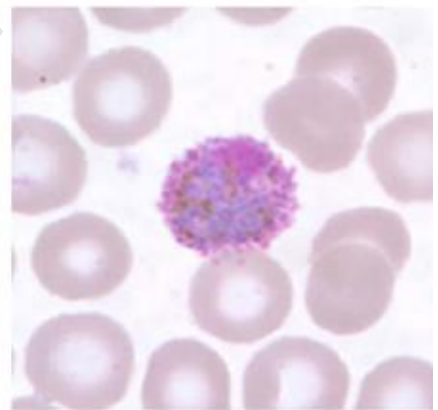
Gametocito en eritrocito desfleado en extendido hemático.



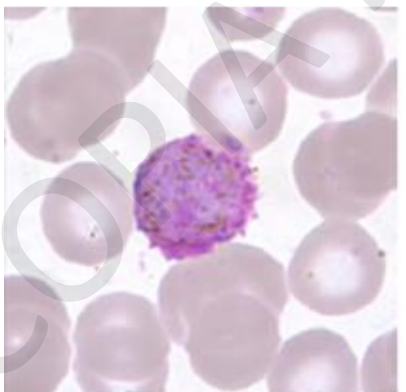
Macrogametocito en extendido hemático.



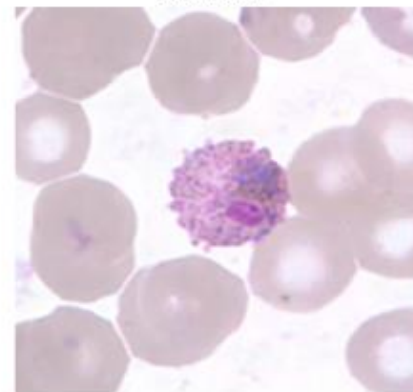
Gametocito en extendido hemático. Se observan granulaciones de Schuffner.



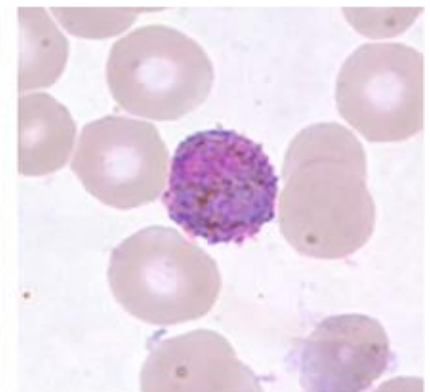
Gametocito con pigmento grueso en extendido hemático.



Microgametocito en extendido hemático. Se observa pigmento difuso.

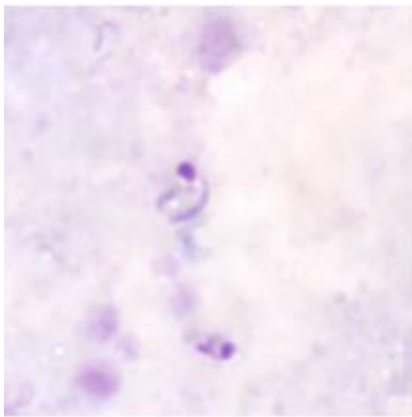


Gametocitos en extendido hemático.

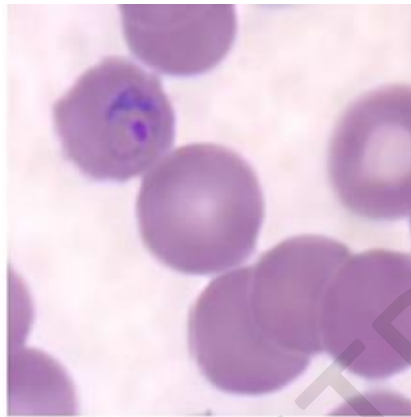


19.3.4. *Plasmodium malariae*

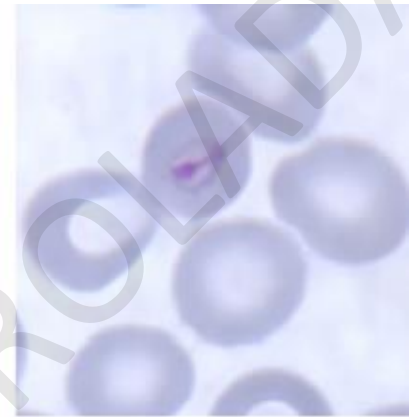
Trofozoítos jóvenes



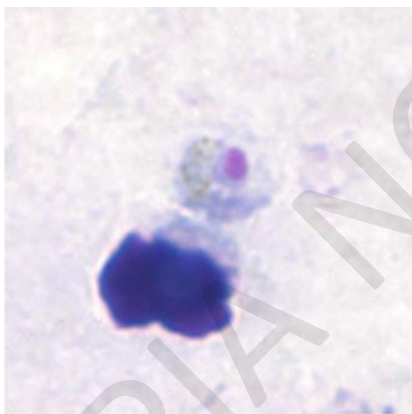
Trofozoíto joven en gota gruesa.



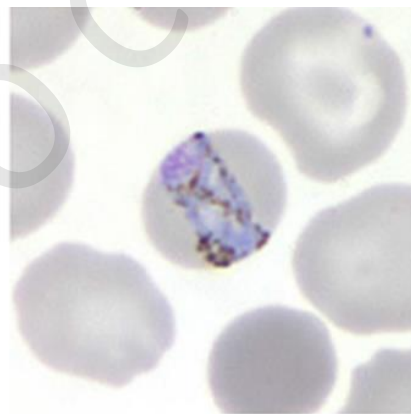
Trofozoítos jóvenes en extendido hemático.



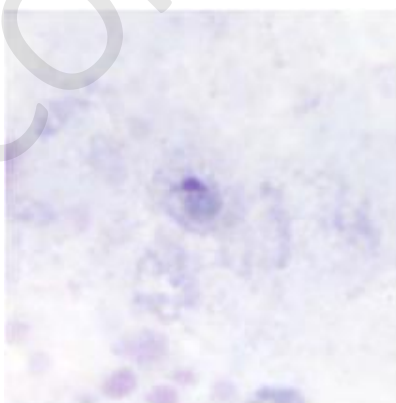
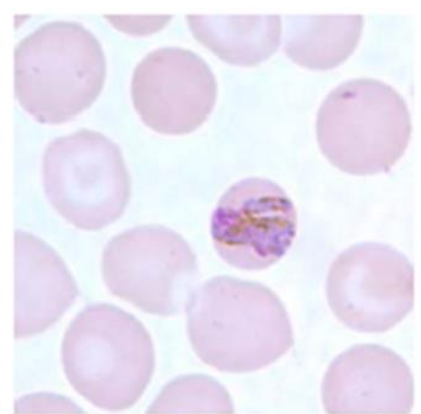
Trofozoítos maduros



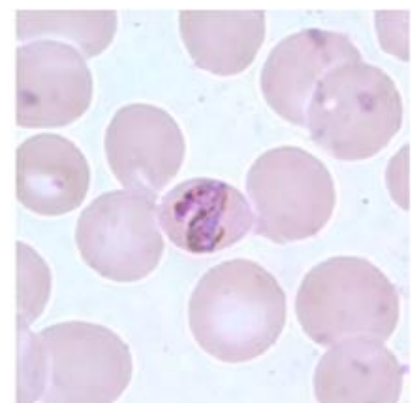
Trofozoíto maduro en gota gruesa.



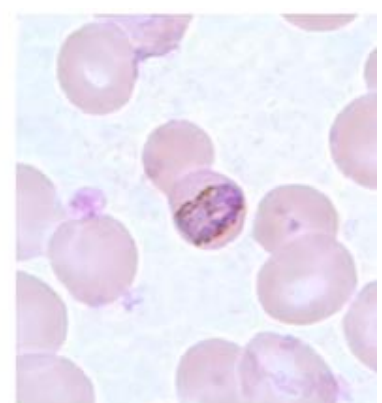
Trofozoítos maduros en banda en extendido hemático.



Trofozoíto maduro en gota gruesa.

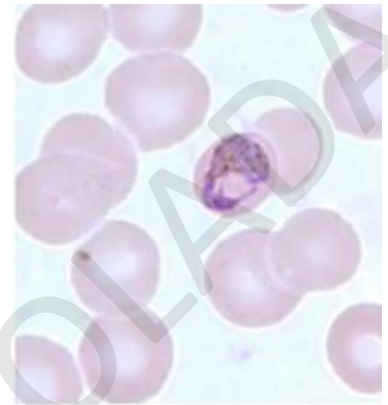
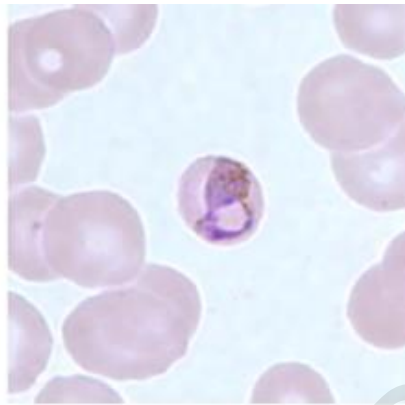
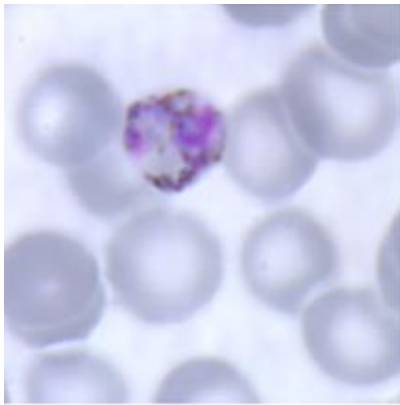


Trofozoítos maduros en forma de banda en extendido hemático.

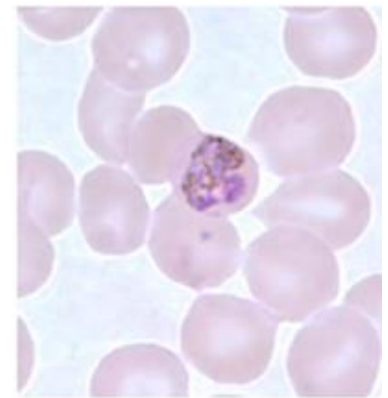
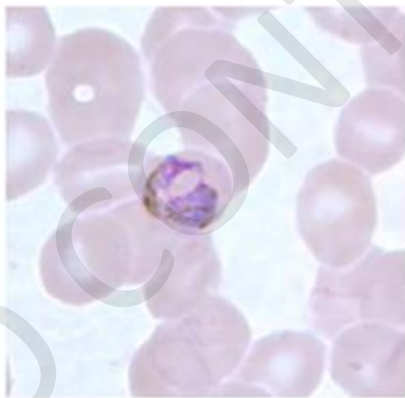
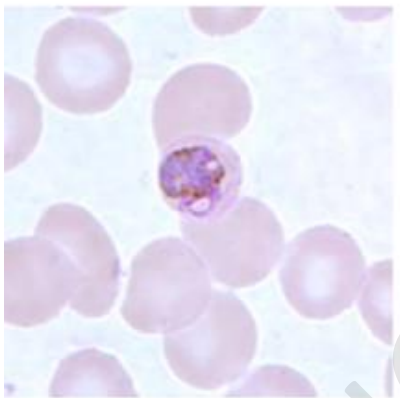


Diagnóstico laboratorial de paludismo

Trofozoítos maduros (forma de canasta)



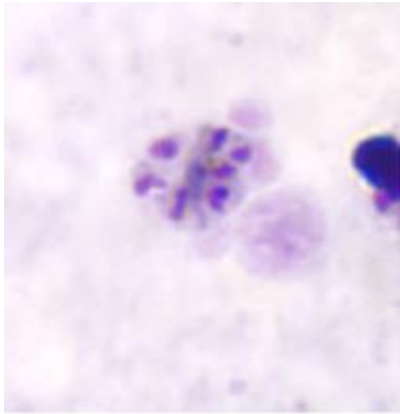
Trofozoítos maduros en forma de canasta en extendido hemático.



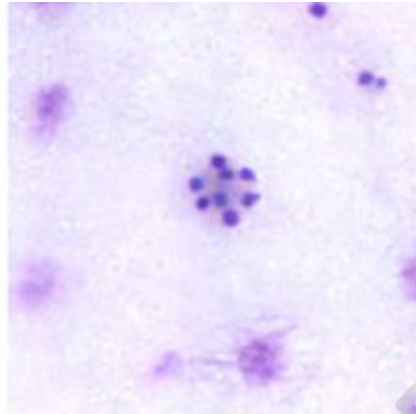
Trofozoítos maduros en forma de canasta (mostrando variaciones) en extendido hemático.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

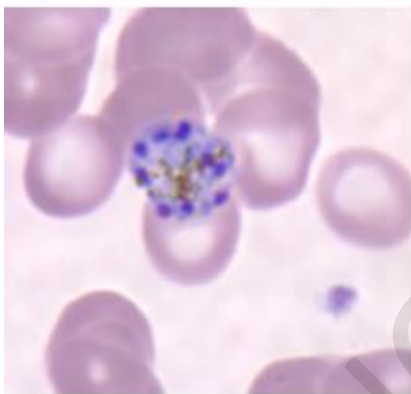
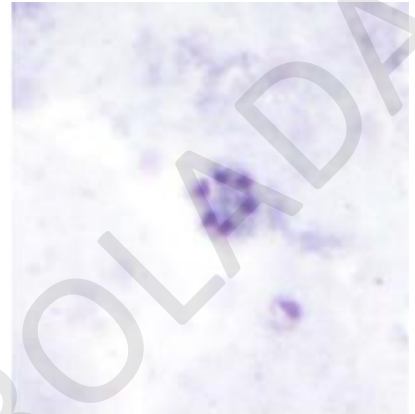
Esquizontes



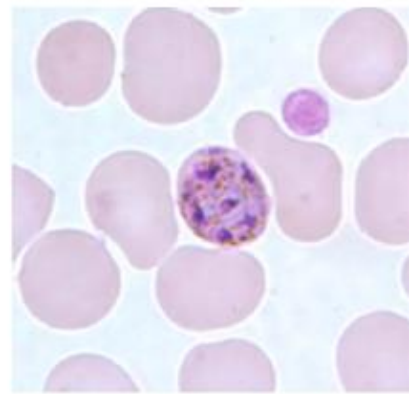
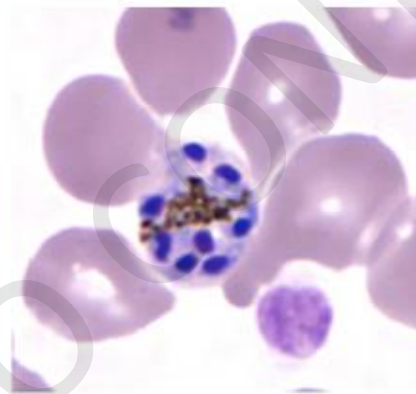
Esquizonte en gota gruesa.



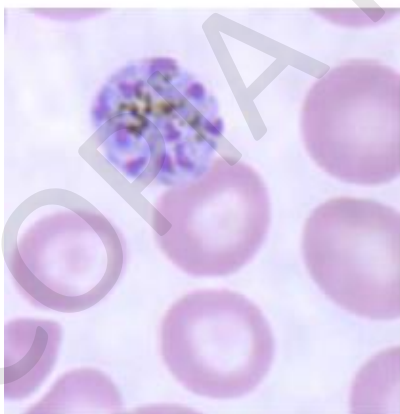
Esquizonte en forma de roseta en gota gruesa.



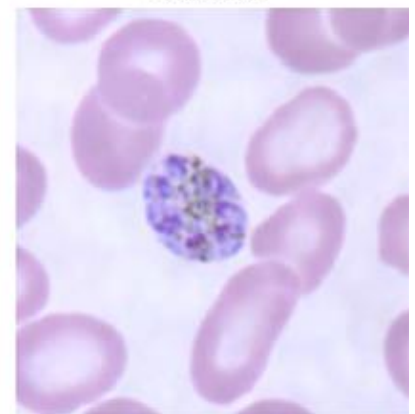
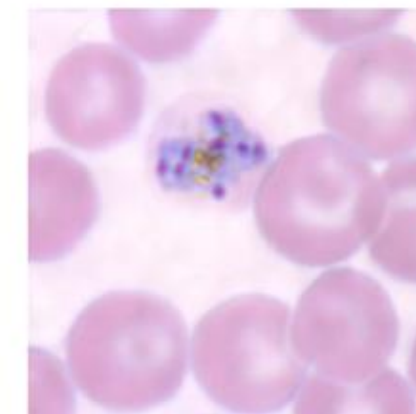
Esquizontes en extendido hemático.



Esquizonte en extendido hemático.
Se observa patrón de roseta de los merozoítos



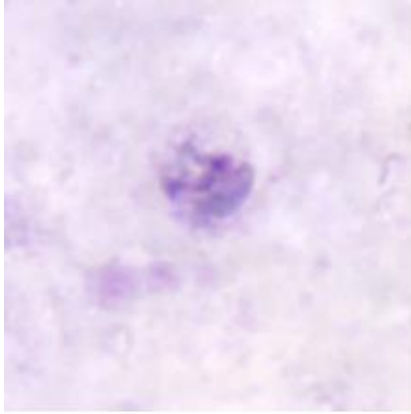
Esquizontes en extendido hemático.



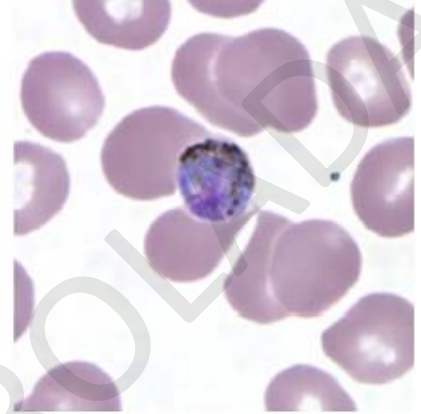
Esquizonte en forma de roseta en
extendido hemático.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

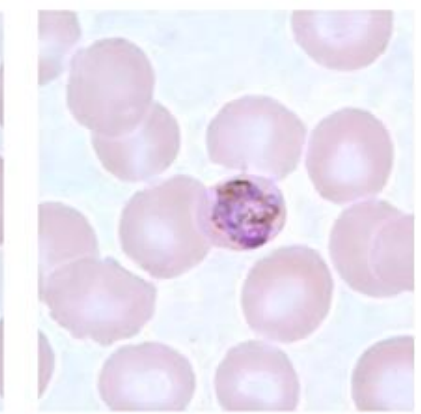
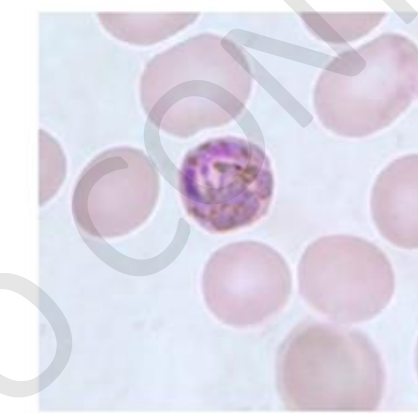
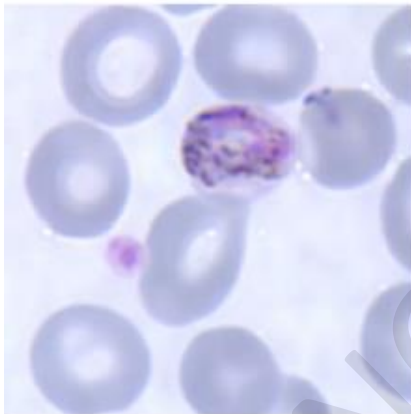
Gametocitos



Gametocitos en gota gruesa.



Gametocito en extendido hemático



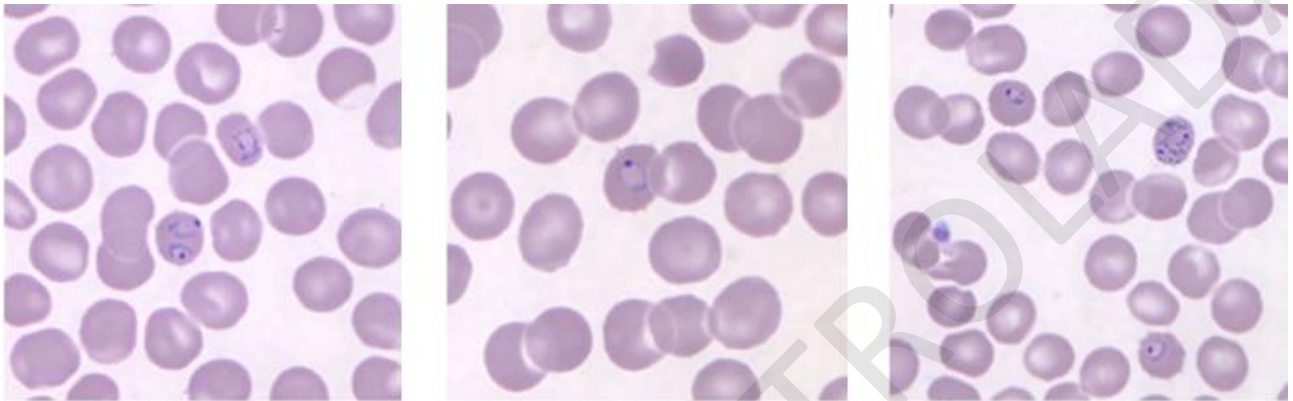
Gametocitos en extendido hemático

COPIA NO CONTROLADA

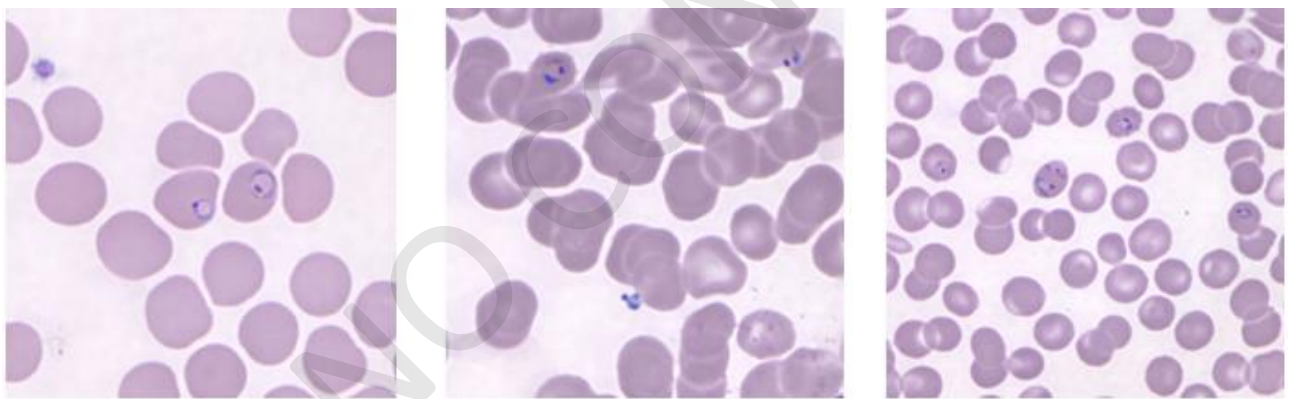
Diagnóstico laboratorial de paludismo

19.3.5. *Plasmodium knowlesi*

Trofozoítos jóvenes

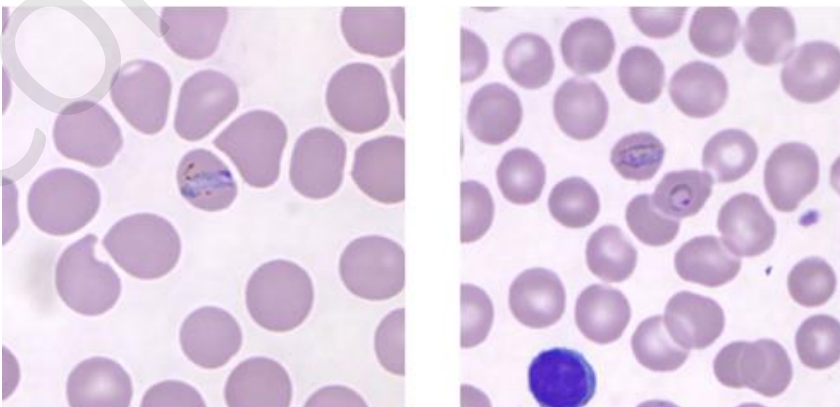


Trofozoítos jóvenes en extendido hemático. Se observan algunos eritrocitos multiparasitados.

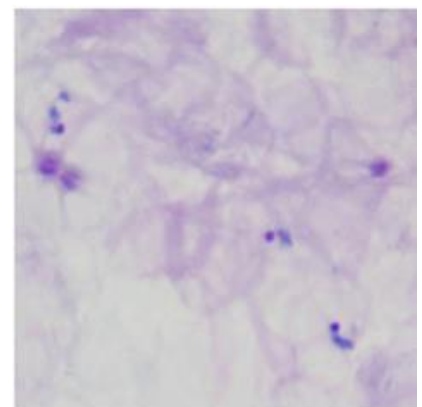


Trofozoítos jóvenes en extendido hemático. Se observan algunos eritrocitos multiparasitados.

Trofozoítos maduros



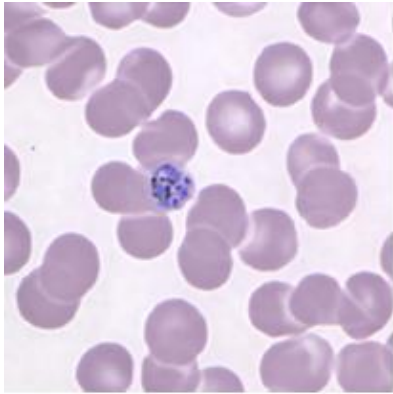
Trofozoítos maduros en extendido hemático. Se observan formas en banda.



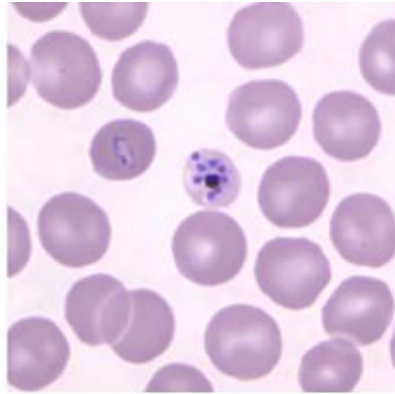
Trofozoítos maduros en gota gruesa.

Diagnóstico laboratorial de paludismo

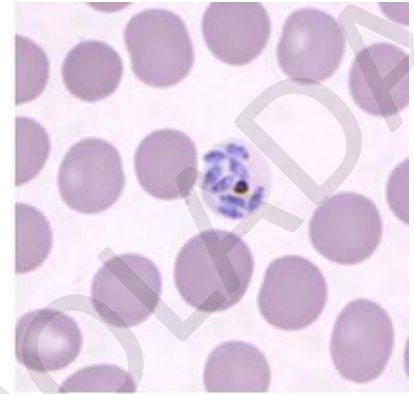
Esquizontes



Esquizonte joven en extendido hemático.

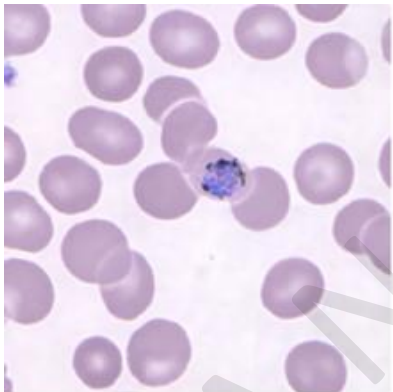


Esquizonte y trofozoito en extendido hemático.

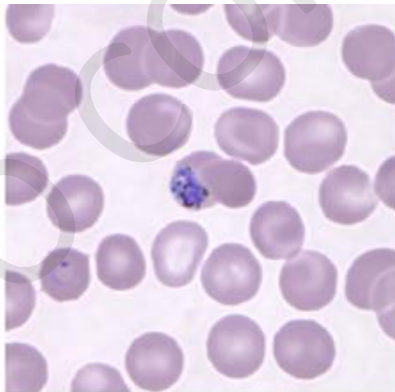


Esquizonte maduro en extendido hemático.

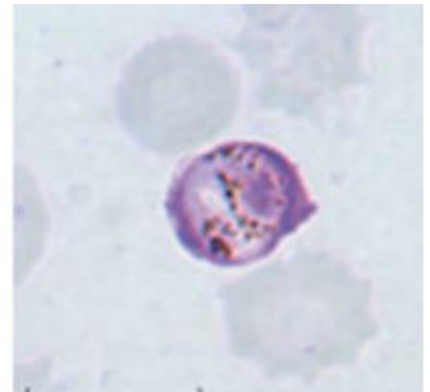
Gametocitos



Gametocito en extendido hemático.



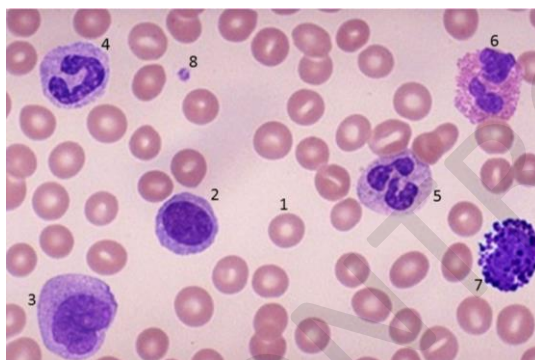
Gametocito y trofozoito en extendido hemático.



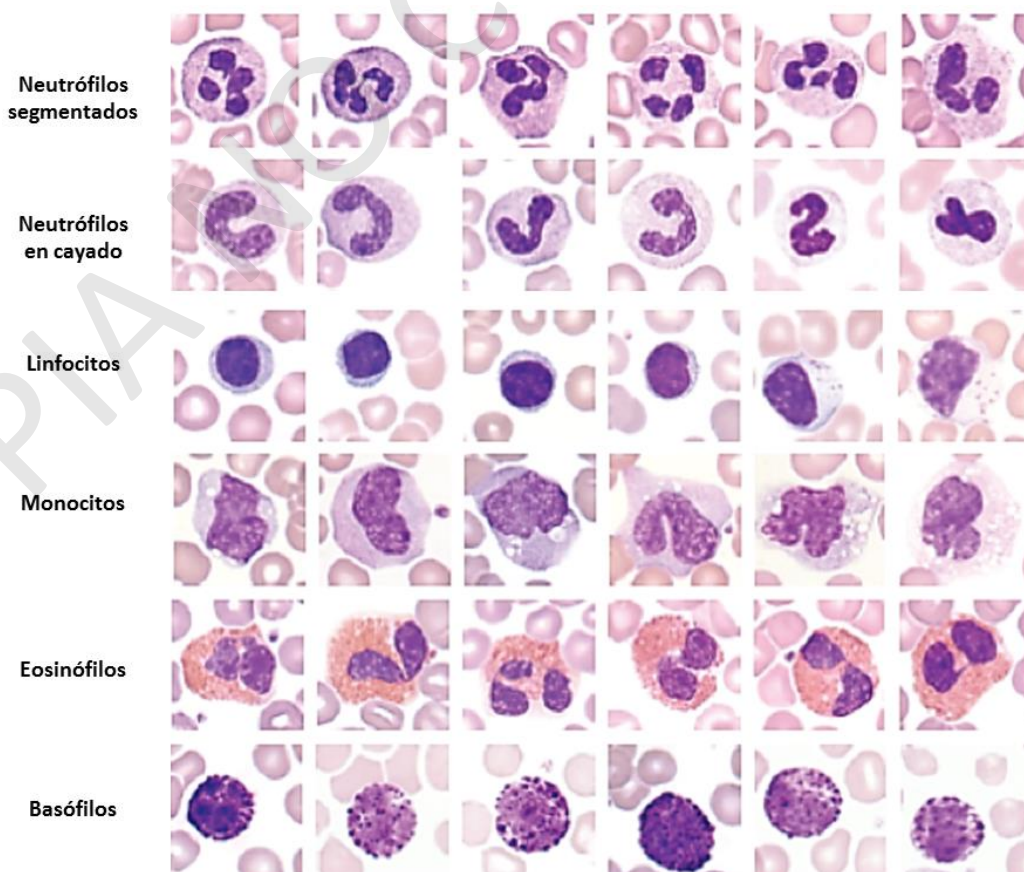
Gametocito en extendido hemático.

19.4. LÁMINAS FOTOGRÁFICAS AUXILIARES PARA DIAGNÓSTICO DE DIFERENCIAL

19.4.1. Componentes celulares de la sangre



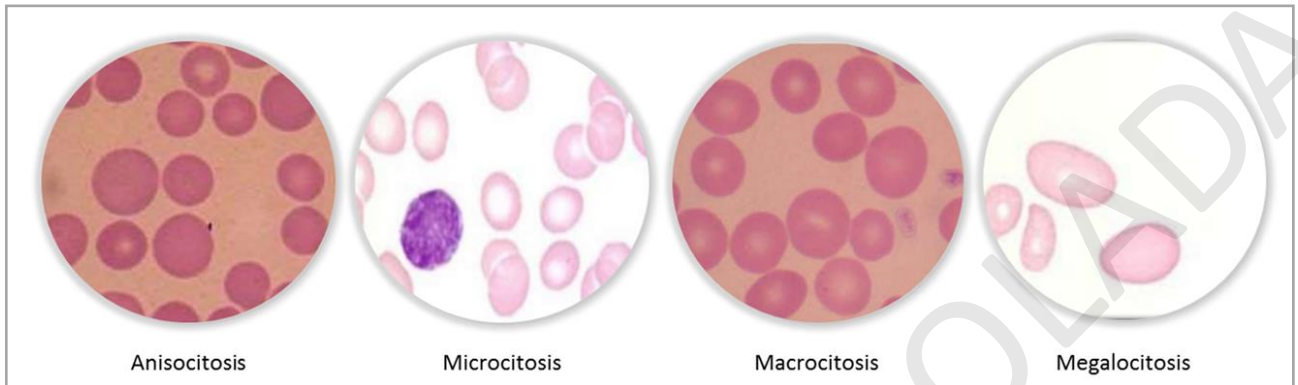
Componentes celulares sanguíneos en extendido hemático. 1, eritrocito; 2, linfocito; 3, monocito; 4, neutrófilo en cayado; 5, neutrófilo segmentado; 6, eosinófilo; 7, basófilo; 8, plaqueta.



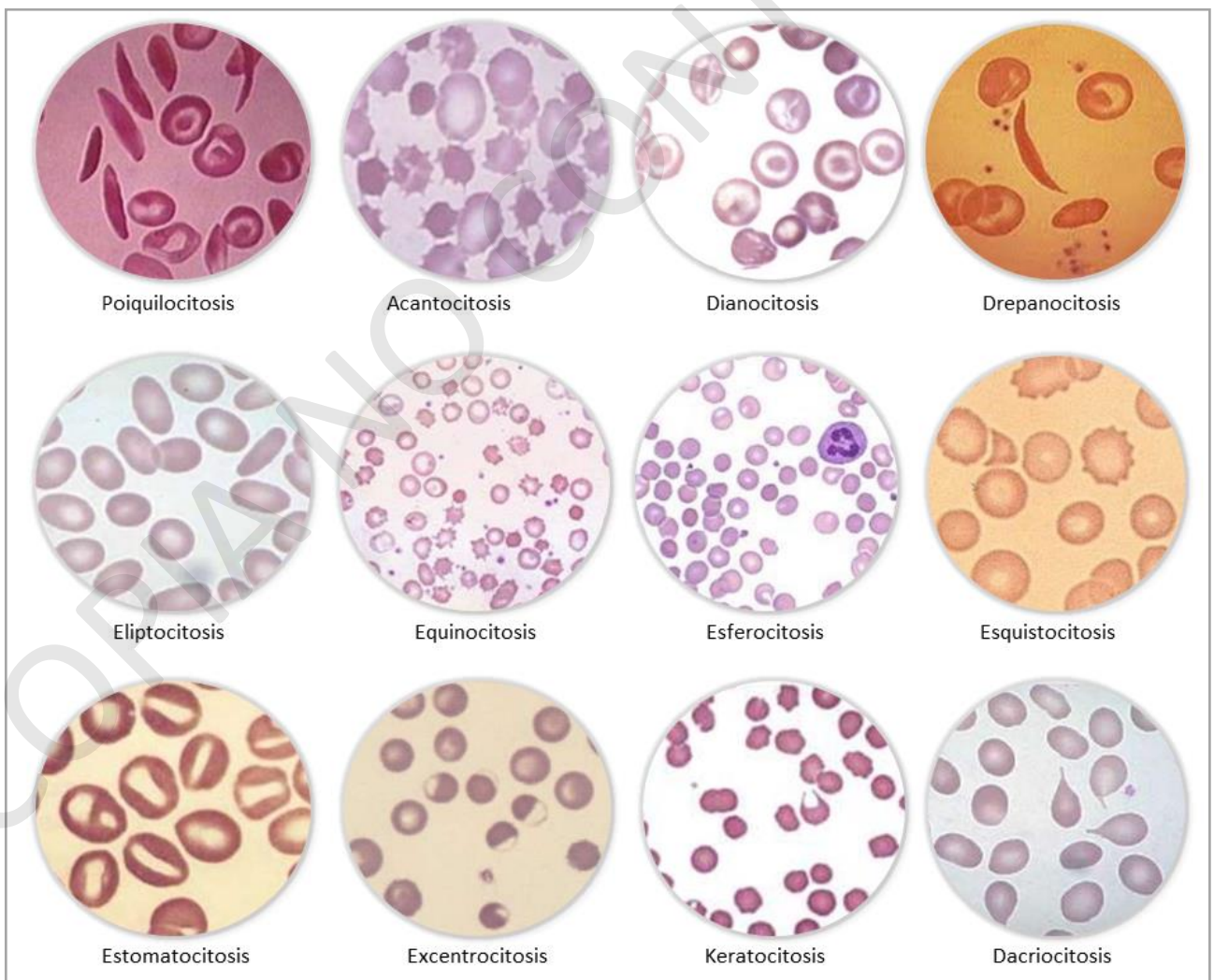
Tipos de leucocitos

Diagnóstico laboratorial de paludismo

19.4.2. Alteraciones de los eritrocitos

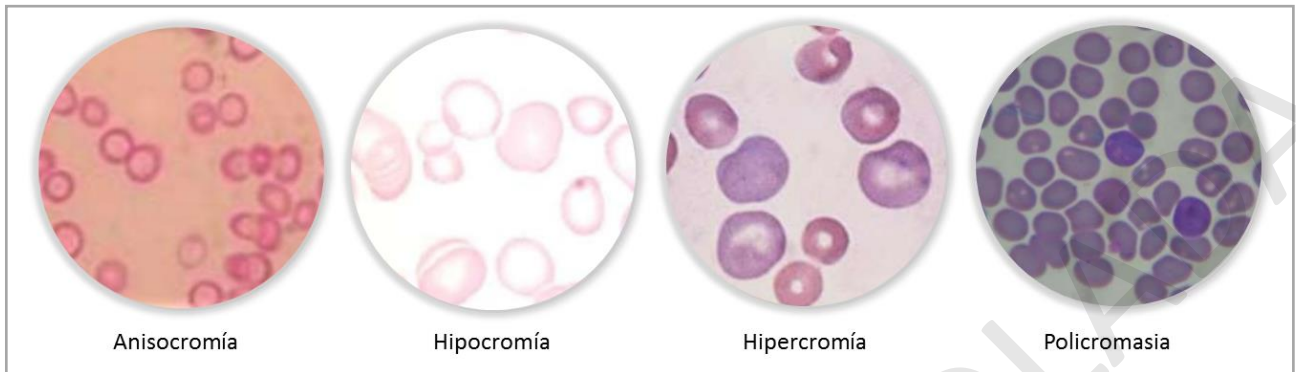


Anormalidades en el tamaño de los eritrocitos

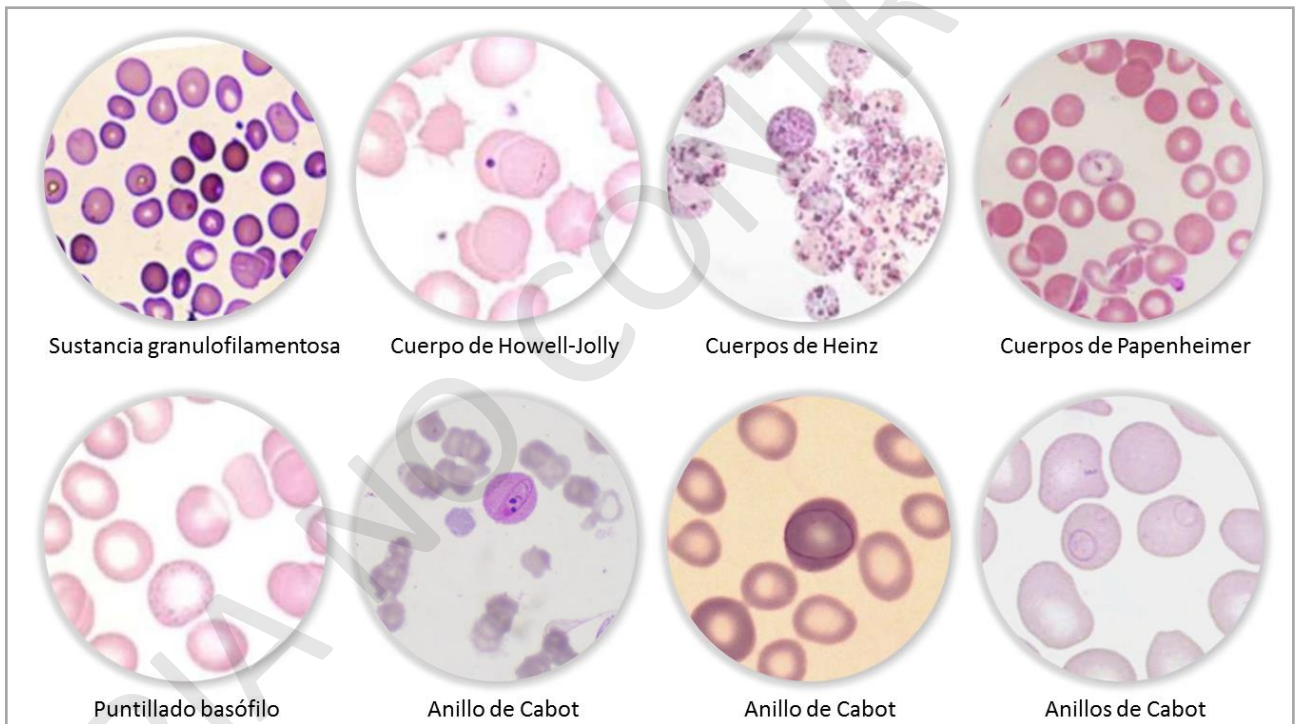


Anormalidades en la forma de los eritrocitos

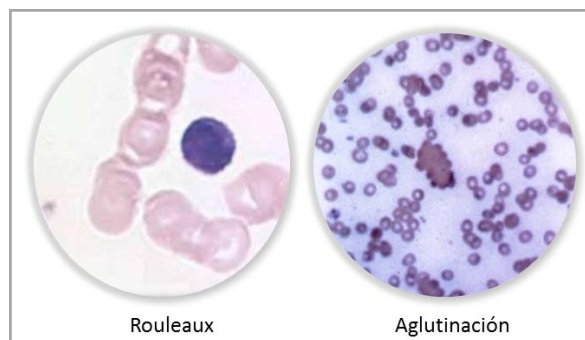
Diagnóstico laboratorial de paludismo



Anormalidades en el color de los eritrocitos



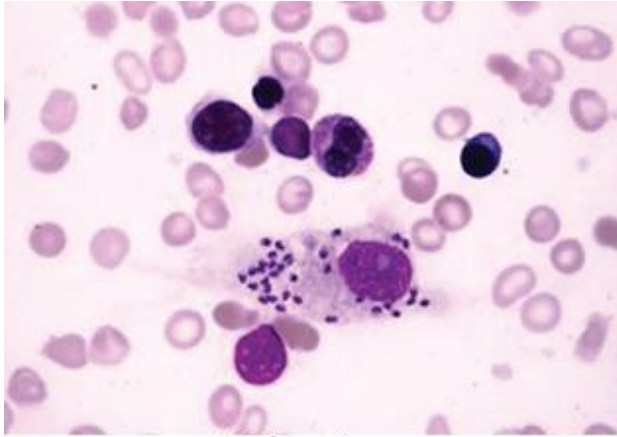
Inclusiones intraeritrocitarias



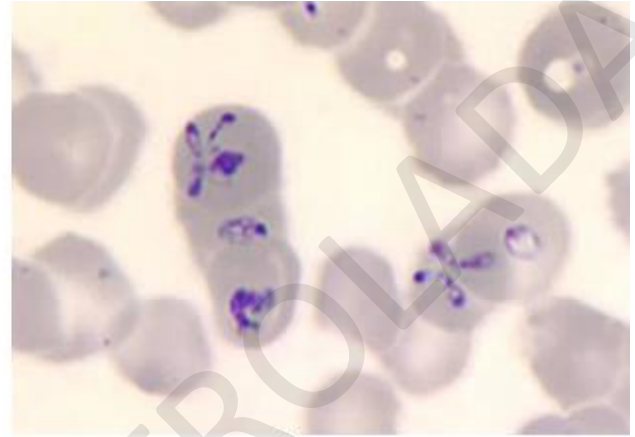
Anormalidades en la distribución de los eritrocitos

Diagnóstico laboratorial de paludismo

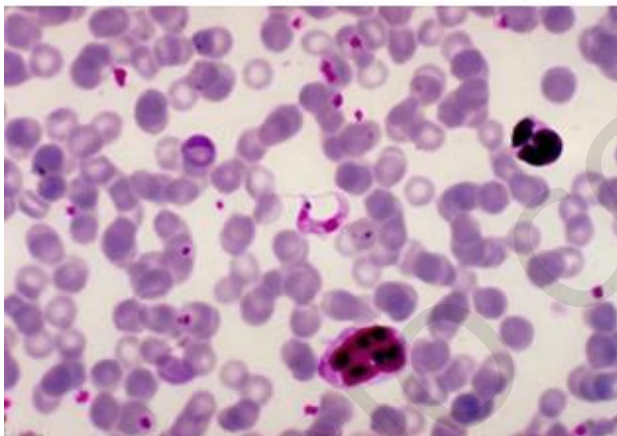
19.4.3. Otros parásitos o microorganismos



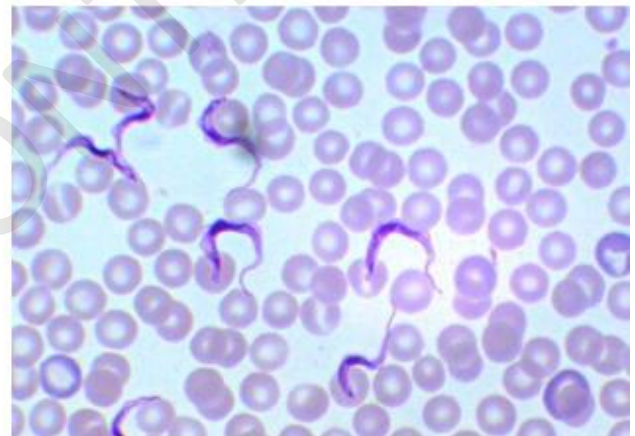
Leishmania sp.



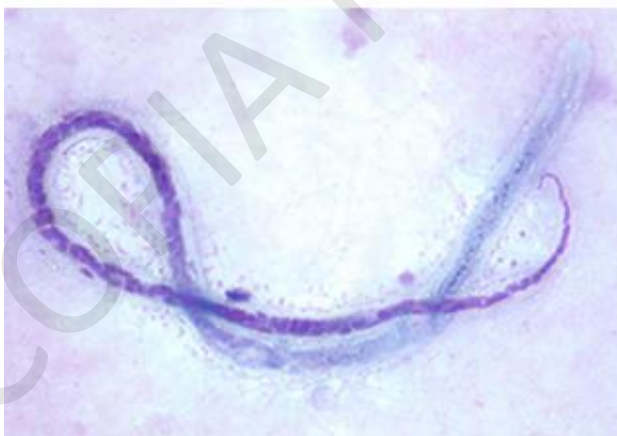
Babesia sp.



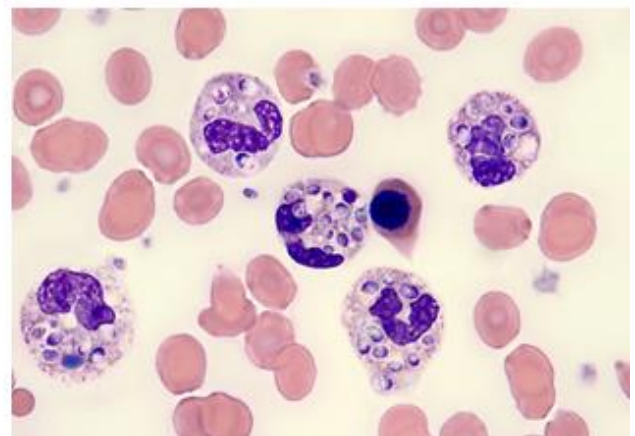
Trypanosoma cruzi



Trypanosoma brucei gambiense



Mansonella ozzardi



Histoplasma capsulatum