GOBIERNO DE EL SALVADOR

MINISTERIO DE SALUD

# Lineamientos técnicos para el diagnóstico microscópico de la malaria

Documento Derogado

GOBIERNO
DE EL SALVADOR

MINISTERIO
DE SALUD

Documento Derogado

# Lineamientos técnicos para el diagnóstico microscópico de la malaria

San Salvador, El Salvador, Septiembre 2019

2019 Ministerio de Salud

Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)

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

La documentación oficial del Ministerio de Salud puede consultarse en el Centro de Documentación Virtual en: http://asp.salud.gob.sv/regulacion/default.asp

Edición: Unidad de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Vectores

Ilustraciones o imágenes: Unidad de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Vectores

Impresión:

Ministerio de Salud
Calle Arce N° 827, San Salvador. Teléfono: 2591-7000
Página oficial: http://www.salud.gob.sv/

Documento Derogado

## Autoridad

Dra. Ana del Carmen Orellana Bendek
Ministra de Salud

Dr. Carlos Gabriel Alvarenga Cardoza
Viceministro de Salud

Documento Derogado

## Equipo técnico

| | |
|---|---|
| Ing. Luis Alberto Guerrero | Dirección de Salud Ambiental |
| Lic. Luis Francisco López | Dirección de Regulación y Legislación en Salud |
| Ing. René Cruz González | |
| Ing. José Eduardo Romero | Unidad de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Vectores |
| Dr. Kelvin Francisco Alfaro Salguero | |
| Lic. Carlos Enrique Estupinian | |
| Licda. Marta Alicia Ramírez | Laboratorio Nacional de Referencia |

## Comité consultivo

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

Documento Derogado

# Índice

## Contenido

**I. Introducción**.....1
**II. Base Legal**.....2
**III. Objetivos**.....3
**IV. Ámbito de aplicación**.....3
**V. Contenido técnico**.....4
5.1. La malaria como enfermedad.....4
5.2. Ciclo biológico de la malaria.....4
5.3. Criterios de bioseguridad para el personal de laboratorio.....6
5.4. Diagnóstico microscópico de la malaria.....9
5.5. Densidad parasitaria.....33
5.6 Limpieza y almacenamiento de los portaobjetos para el diagnóstico microscópico de malaria.....36
5.7. Control de calidad.....38
**VI. Disposiciones finales**.....41
**VII. Vigencia**.....41
**VIII. Glosario de términos**.....42
**IX. Siglas y abreviaturas**.....44
X. Bibliografía.....45

Documento Derogado

# I. Introducción

En el marco de la profundización de la Reforma de Salud, es indispensable la actualización de los diferentes documentos normativos, lo cual garantiza su consolidación y el cumplimiento de la Política Nacional de Salud (2015-2019).

Profundizar la Reforma de Salud constituye un reto y compromiso para garantizar a la población el derecho a la salud, la mejor forma de lograrlo es la unificación y el fortalecimiento integral, progresivo y creciente del sistema público de salud.

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

El Plan Estratégico Nacional Multisectorial de eliminación de la transmisión autóctona de la malaria en El Salvador 2016-2020 (PENMEM-ES) ha considerado áreas prioritarias como la detección precoz de la enfermedad, el control vectorial, la promoción de la salud, la vigilancia epidemiológica, entomológica y de laboratorio; las pruebas diagnósticas así como el manejo y tratamiento de los casos con enfoque de género y derechos humanos; lo que representa el compromiso de todas las entidades nacionales en colaboración y coordinación para alcanzar la meta de eliminar la transmisión autóctona de la malaria, esfuerzo que requiere de un compromiso compartido y la participación consciente y voluntaria de las comunidades.

En el marco del PENMEM-ES, el Ministerio de Salud (MINSAL) junto con la sección de malaria del Laboratorio Nacional de Salud Pública (LNR) realizaron un proceso de revisión, validación y socialización de material formativo para profesionales de laboratorio a nivel nacional, con el fin de continuar el esfuerzo de eliminación de malaria en el país, el material será utilizado por los profesionales de laboratorio de los diferentes establecimientos de salud.

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

En el presente documento se destacan los lineamientos de bioseguridad imprescindibles que los profesionales deben seguir en el laboratorio para protección personal y el equipo a utilizar.

Se brinda una detallada descripción de la toma de muestras, la limpieza de los portaobjetos y errores que deben prevenirse al recolectar muestras. Además, se enuncian los materiales y procedimientos de tinción, la observación microscópica del parásito y los diferentes estadios, densidad parasitaria, forma correcta de conteo y reporte.

Además, se describen los 3 métodos de evaluación de la calidad para asegurar la precisión de los resultados. Seguido de un glosario, abreviaturas y siglas y una serie de anexos útiles para toma y lectura de muestras de sangre para diagnóstico de malaria.

Documento Derogado

# II. Base Legal

## Constitución de la República

**Art. 65.-** La salud de los habitantes de la República constituye un bien público. El Estado y las personas están obligados a velar por su conservación y restablecimiento.

## Código de Salud

**Art. 40.-** El Ministerio de Salud, es el organismo encargado de determinar, planificar y ejecutar la política nacional en materia de Salud; dictar las normas pertinentes, organizar, coordinar y evaluar la ejecución de las actividades relacionadas con la Salud.

**Art. 41.-** Corresponde al Ministerio:
*Numeral 4:* "Organizar, reglamentar y coordinar el funcionamiento y las atribuciones de todos los servicios técnicos y administrativos de sus dependencias".

**Art. 42.-** Compete al Ministerio de Salud:
*Numeral 2:* "Dictar las Normas y técnicas en materia de salud y ordenar las medidas y disposiciones que sean necesarias para resguardar la salud de la población".

**Art. 79.-** El Ministerio de Salud
Es el organismo responsable de emitir las medidas y disposiciones que sean necesarias para resguardar la salud de la población, contra insectos, u otros animales que pudieren transmitir enfermedades al ser humano o alterar su bienestar.

**Art. 129.-** Código de Salud
Se declaran de interés público, las acciones permanentes del Ministerio, contra las enfermedades transmisibles y zoonosis.

**Art. 130.-** Código de Salud
El Ministerio tendrá a su cargo en todos sus aspectos el control de las enfermedades transmisibles y zoonosis, para lo cual deberán prestarle colaboración todas aquellas instituciones públicas y privadas en lo que sea de su competencia.

Documento Derogado

# III. Objetivos

## a) General

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

## b) Específicos

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

# IV. Ámbito de aplicación

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

Documento Derogado

# V. Contenido técnico

## 5.1. La malaria como enfermedad.

La malaria o paludismo se define como una enfermedad infecciosa producida por un parásito protozoario del género *Plasmodium* y del cual se conocen cuatro especies: *Plasmodium vívax, Plasmodium falciparum, Plasmodium malariae y Plasmodium ovale*. La infección sucede cuando un mosquito hembra del género *Anopheles* (Figura 5.1) infectada pica al humano y le inocula los parásitos.

La malaria puede ser también adquirida por la inoculación de sangre fresca o sus derivados infectados, mediante el uso de agujas contaminadas o por medio de transfusiones sanguíneas que contienen *Plasmodium.*

## 5.2. Ciclo biológico de la malaria

Un mosquito hembra, infectado con *Plasmodium*, al picar vierte al torrente sanguíneo las formas infectantes para el hombre (esporozoítos), los cuales permanecen en sangre periférica aproximadamente 30 minutos; luego penetran a las células del hígado, en donde comienzan a multiplicarse de inmediato, (fase preeritrocítica). Mientras crecen, su núcleo se divide rápidamente formando esquizontes hepáticos, los que se fraccionan dejando en libertad parásitos jóvenes o merozoitos, que llegan al torrente circulatorio e invaden los glóbulos rojos, iniciándose la fase eritrocítica, que produce el cuadro clínico ya descrito.

Algunos de estos esporozoítos permanecen en las células del hígado como formas durmientes llamadas hipnozoítos, las que al reactivarse pueden dar lugar a las recaídas, desarrollando una nueva esquizogonia exo-eritrocítica, dando lugar a la repetición del ciclo anterior. Las especies de *Plasmodium* que producen recaídas son *Plasmodium vívax* y *Plasmodium ovale,* este último no se encuentra en América.

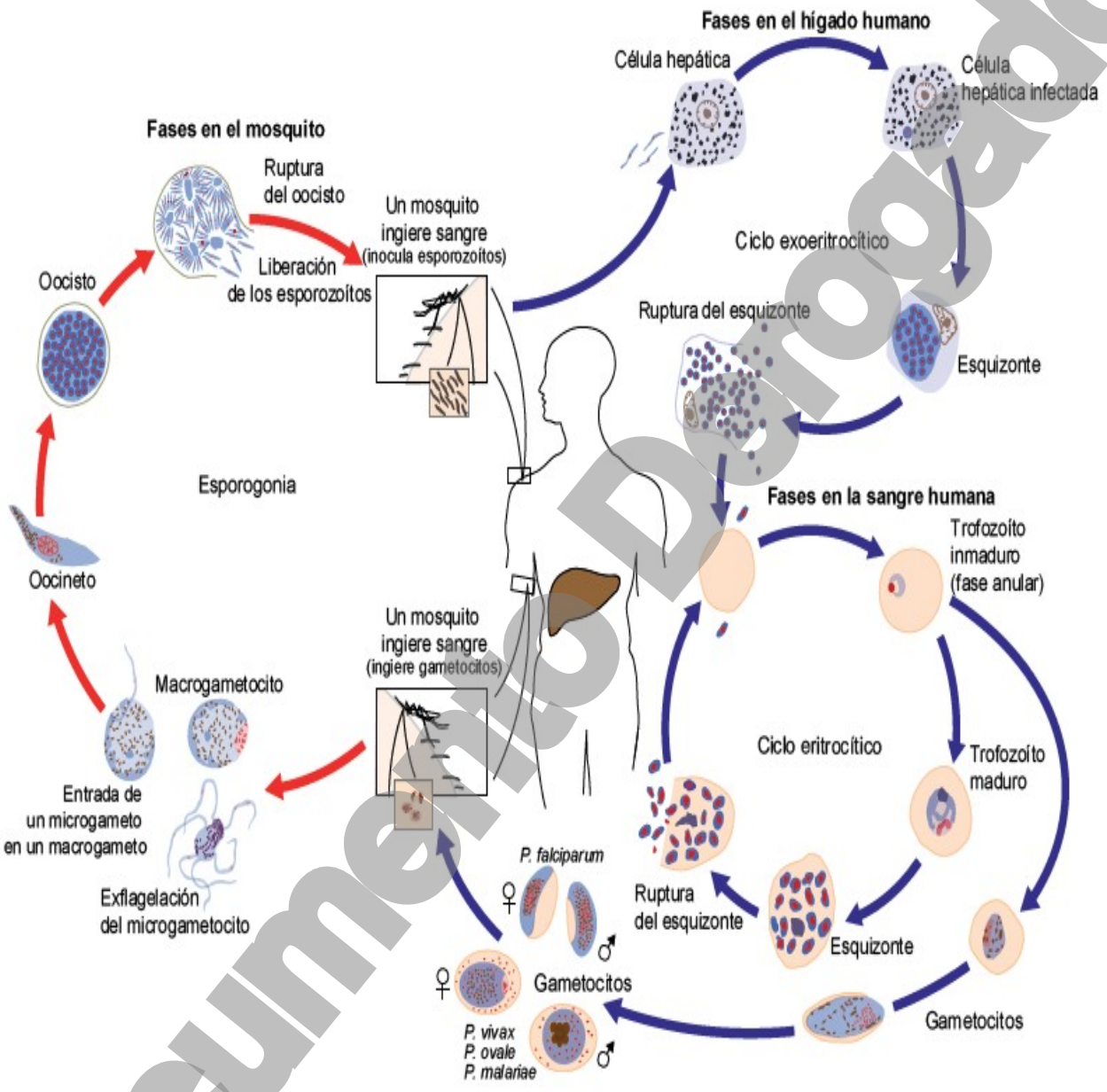
Estos merozoitos se desarrollan y adquieren la forma de anillo o trofozoíto, cada uno de estos se multiplica dentro del glóbulo rojo, dando lugar a merozoítos los que forman una estructura en forma de roseta o margarita llamada esquizonte.

Estos esquizontes al ser liberados invaden nuevos glóbulos rojos, repitiendo el ciclo anterior (esquizogónico o asexual), mientras que otros parásitos invaden el glóbulo rojo convirtiéndose en forma sexuales o gametocitos, los cuales son infectantes para el mosquito.

El mosquito al alimentarse de sangre de una persona infectada ingiere los gametos masculinos y femeninos, el gameto masculino (microgametocito) sufre una exflagelación, estos flagelos fecundan a los gametocitos femeninos (macrogametocitos), (fase sexual).

Documento Derogado

**Figura 5.1 Ciclo de transmisión de la Malaria**




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

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

Documento Derogado

## 5.3. Criterios de bioseguridad para el personal de laboratorio

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

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

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

### 5.3.1. Cuidados generales

Todos los laboratorios deben contar con medidas preventivas como:

- Preparar planes que vayan destinados a enfrentar los accidentes que se presenten y estos deben colocarse en lugares visibles a todo el personal.
- Poseer un botiquín de emergencia en el laboratorio que contenga como mínimo lo siguiente:
    - ✓ Gasa,
    - ✓ Vendas,
    - ✓ Esparadrapo,
    - ✓ Alcohol,
    - ✓ Algodón,
    - ✓ Analgésicos,
    - ✓ Agua destilada estéril,
    - ✓ Agua oxigenada,
    - ✓ Crema hidratante y
    - ✓ Jabón líquido.

  Este debe revisarse frecuentemente para renovar su contenido, de no ser posible contar con un botiquín, el personal debe ser atendido en el área de emergencia del establecimiento.
- Cerca del conmutador, teléfono de la secretaria y jefatura, debe colocarse en forma clara, los siguientes:
    - ✓ Director de la institución,
    - ✓ Jefe de laboratorio
    - ✓ Administración nacional de acueductos y alcantarillados (ANDA)
    - ✓ Distribuidor de electricidad,
    - ✓ Cuerpo de bomberos,
    - ✓ Paramédicos,
    - ✓ Policía Nacional Civil (PNC)
    - ✓ Hospital de la localidad,
    - ✓ Servicios de ambulancia,
    - ✓ Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS)

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

Documento Derogado

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

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

### 5.3.2. Cuidados durante la manipulación de la muestra.

El personal de laboratorio durante la manipulación de las muestras no debe realizar las siguientes acciones:

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

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

### 5.3.3. Cuidado personal

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

### 5.3.4. Lavado de Manos

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

### 5.3.5. Vacunas

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

Documento Derogado

sangre y líquidos corporales.

### 5.3.6. Equipo de protección personal (EPP) y colectivo

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

El equipo básico consta de:

- ✓ Gabacha.
- ✓ Gafas o protectores faciales.
- ✓ Guantes.
- ✓ Mascarilla.

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

- ✓ Gorro,
- ✓ Doble guante,
- ✓ Delantal u otros según actividad a desarrollar.

#### 5.3.6.1 Gabacha

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

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

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

La jefatura de laboratorio debe garantizar que las gabachas del personal estén en buen estado y limpias.

#### 5.3.6.2 Mascarilla

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

#### 5.3.6.3 Gafas protectoras o protectores faciales

Utilizar siempre que se hagan procedimientos con exposición a salpicaduras o impactos.
Las gafas protectoras deben ser de material rígido y deben cubrir completamente el área de los ojos.
Los anteojos de uso personal no sustituyen los lentes de protección.

#### 5.3.6.4 Guantes

Usar guantes obligatoriamente en los siguientes casos:

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

Documento Derogado

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

Los guantes deben quitarse cuando se transcriban datos o se digiten en los aparatos automatizados, al responder el teléfono y abrir puertas, pues estos representan una fuente de contaminación para cualquier superficie.
Al descartar los guantes debe hacerse en los depósitos que contienen desechos bioinfecciosos.

### 5.3.7. Equipo de protección colectivo

Los equipos de protección colectivo son:

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

### 5.3.8. Accidentes de laboratorio

El personal de laboratorio debe estar capacitado en los aspectos de bioseguridad, que impliquen accidentes de trabajo.
Todos los accidentes ocurridos deben ser comunicados al jefe inmediato y en caso de sospecha de contaminación con VIH consultar la guía para el sistema de información de profilaxis post exposición al VIH. (Ver Anexo 1).

## 5.4. Diagnóstico microscópico de la malaria

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

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

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

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

### 5.4.1. Preparación de las extensiones sanguíneas

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

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

Documento Derogado

### 5.4.2. Tipos de extensiones sanguíneas

#### 5.4.2.1 Extensión de gota gruesa

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

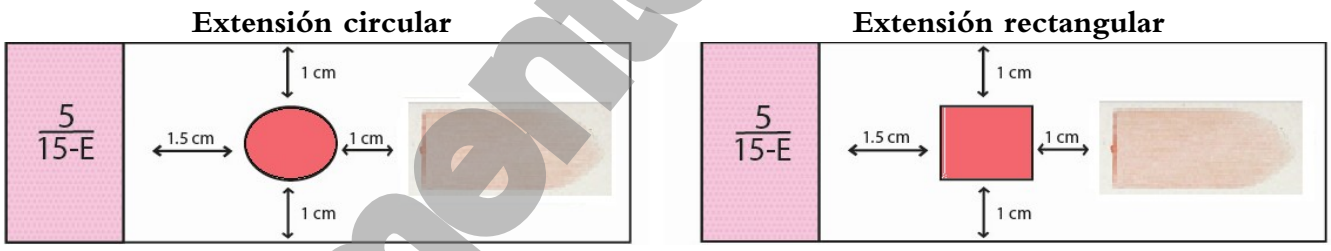
La gota gruesa debe cumplir con los requisitos en tamaño, ubicación, grosor y extensión.

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

#### 5.4.2.2. La extensión de frotis

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

**Figura 5.3 Patrón de toma de muestra de gota y frotis**




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

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

**Materiales necesarios**

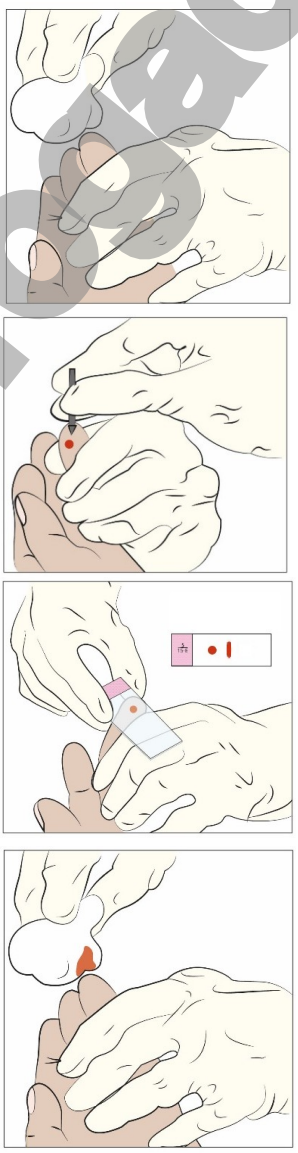
- Formulario de registro de identificación LAB-2 (Ver Anexo 5)
- Guantes protectores
- Lancetas estériles descartables
- Algodón (torundas)
- Alcohol al 70%
- Láminas portaobjetos 3 x 1", esmeriladas previa asepsia
- Contenedor de objetos corto punzantes
- Bandeja de portaobjetos
- Gasas estériles o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

Documento Derogado

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

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

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



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

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

3. Mantener presión suave en dedo y depositar dos o tres gotas de sangre en láminas portaobjeto dejando una distancia de la parte esmerilada a la primera gota, poner gota de sangre para realizar extendido de gota gruesa y extendido para frotis guardando espacios de más o menos 1 cm de distancia la gota para el frotis debe ser de menor tamaño.

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

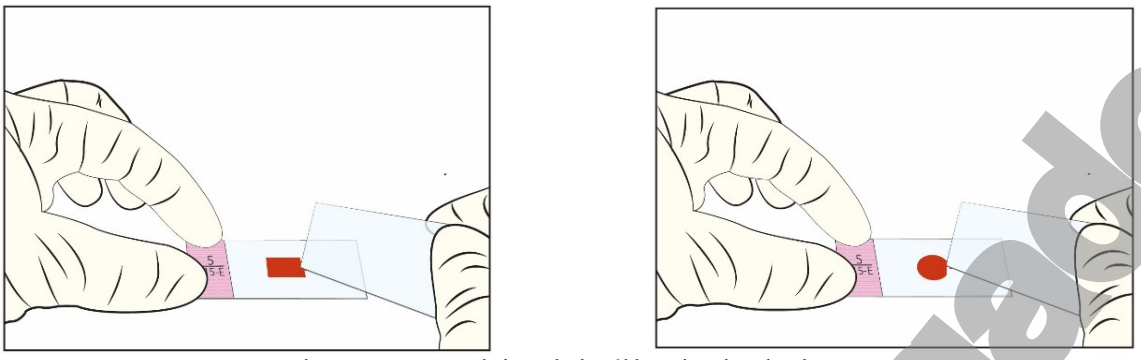
### 5.4.5. Extendido de gota gruesa

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

Se puede hacer una extensión circular o rectangular. (La extensión de la gota debe tener aproximadamente 1 cm de diámetro). Dejar secar, proteger del polvo, moscas, luz solar y calor extremo.

Documento Derogado

**Figura 5.5 Extendido de gota gruesa**

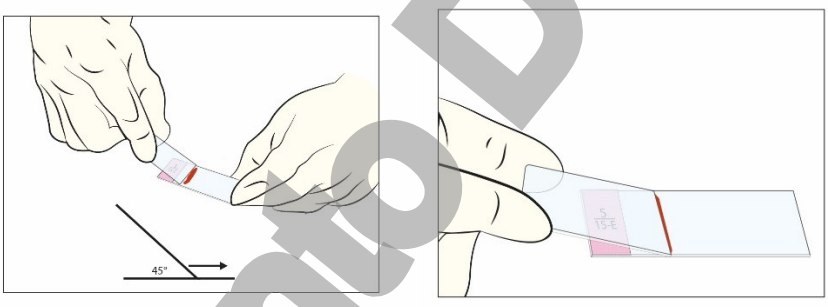


*Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL*

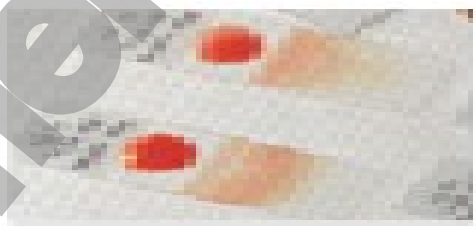
### 5.4.5. Extendido de frotis:

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

**Figura 5.6 Extendido de frotis**




Extensión de gota gruesa y frotis



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

### 5.4.6. Cuidados de las muestras

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

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

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

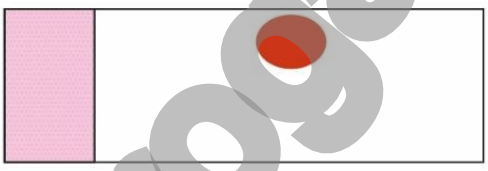
Documento Derogado

### 5.4.7. Errores frecuentes en la preparación de las extensiones sanguíneas

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

#### 5.4.7.1. Extensiones sanguíneas mal situadas

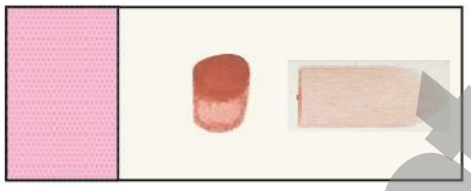
Si las extensiones no están situadas correctamente en el portaobjetos, su examen puede resultar imposible, algunas partes de la gota gruesa pueden desprenderse al rozar con los filos de la cubeta de tinción o la gradilla de secado, cuando la extensión gruesa está mal situada será difícil examinarla con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

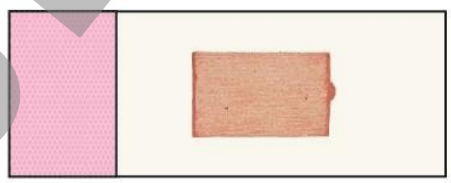


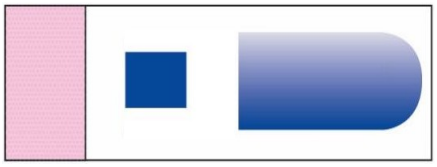
*Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL*

#### 5.4.7.2. Demasiada sangre

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



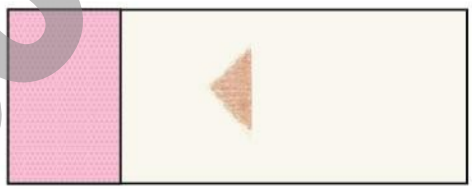


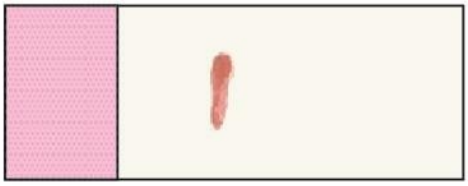


*Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL*

#### 5.4.7.3 Extensiones con poca sangre.

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



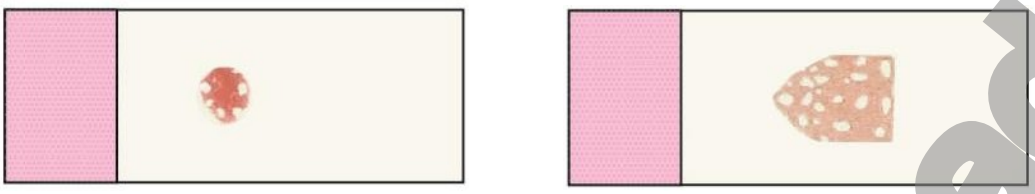


*Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL*

Documento Derogado

#### 5.4.7.4. Portaobjetos grasientos

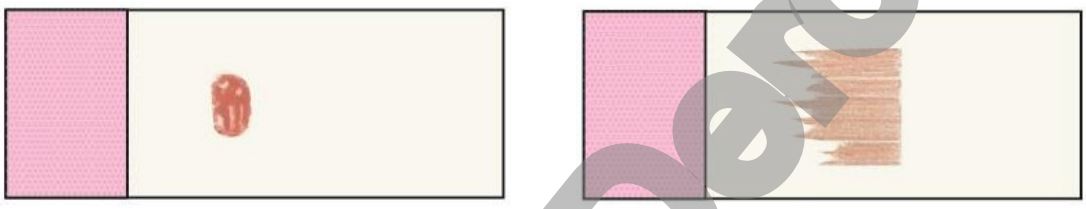
Las extensiones sanguíneas hechas sobre portaobjetos grasientos se extenderán irregularmente, y la gota gruesa se desprenderá parcialmente durante la tinción, en el examen de las gotas gruesas y frotis la distribución de la sangre se observará de forma irregular.



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

#### 5.4.7.5. Portaobjetos astillado

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



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

### 5.4.8. Coloración de gota gruesa y frotis

#### 5.4.8.1. Coloración de Giemsa

La tinción de Giemsa es una tinción de Romanowsky de base alcohólica, el colorante de Giemsa es una mezcla de Eosina que tiñe de rojo o rosa la cromatina del parásito y las sombras punteadas; y el azul de metileno que tiñe de azul el citoplasma del parásito.
Puede llegar a ser casi negro, dependiendo del tipo de glóbulo blanco.

#### 5.4.8.2. Solución amortiguadora

Los *Plasmodium* se ven claramente con el microscopio en extensiones sanguíneas teñidas adecuadamente. Antes de teñir las extensiones, preparar la solución amortiguadora que se utilizará para diluir el colorante, este debe ser preparado diariamente, (Para detalles sobre el uso y cuidados del microscopio, consultar el Anexo 4)
El uso de la solución amortiguadora con el pH correcto contribuye a la obtención de una buena tinción.

**Recomendación para solución Buffer:**

- La solución debe tener un pH adecuado (7.2)

#### 5.4.8.3. Recomendaciones para una buena coloración de gota gruesa

- Mantener el frasco Stock bien tapado para evitar la evaporación del colorante y su oxidación por la humedad elevada.
- Guardar en un frasco de vidrio oscuro, alejado de la luz solar directa.
- Para coloraciones de rutina, pasar pequeñas cantidades de colorante en un frasco bien cerrado de aproximadamente 25 ml, a fin de reducir la contaminación de la solución.
- No añadir agua a la solución Stock; incluso una cantidad mínima producirá un deterioro del colorante que lo volverá progresivamente ineficaz.

Documento Derogado

- No agitar el frasco de colorante antes de utilizarlo, la agitación volvería a suspender los precipitados, que se asentarían en las extensiones durante la tinción y ocultarían detalles importantes durante el examen microscópico.
- No devolver el colorante no utilizado al frasco donde se guarda la solución madre ni al frasco destinado al uso diario, una vez que sale del frasco, el colorante debe usarse rápidamente.

**Materiales**

- Colorante de Giemsa puro
- Metanol
- Tubos de ensayo
- Buffer con pH de 7,2;
- Pipeta con bulbo
- Bandeja para tinción;
- Gradilla para secado de las extensiones;
- Un cronómetro.

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

**5.4.8.4. Método coloración de extensiones gota gruesa y frotis**

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

**El método rápido (al 10%)**

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

***Necesitará:***

- Colorante de Giemsa decantado de la solución madre hacia un frasco de 25 ml;
- Metanol;[1]
- Algodón absorbente;
- Tubos de ensayo de 5 ml;
- Agua destilada o desionizada tamponada con pH de 7,2;
- Una pipeta de Pasteur con perilla de goma;
- Una bandeja de plástico curva, una placa o una gradilla para la tinción;
- Una gradilla de secado de las extensiones;
- Un cronómetro, y
- Un pequeño secador eléctrico.

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

Documento Derogado

Las extensiones gruesas tienen que secarse totalmente antes de teñirlas. Pueden secarse rápidamente con el aire caliente de un pequeño secador o calentándolas con cuidado sobre una lámpara o bombilla. Evite el sobrecalentamiento de la preparación porque puede producir una «fijación por el calor» que impida que se tiña bien.

***El método:***

1. Fije la extensión fina o frotis con unos toques de un algodón empapado en metanol o sumergiéndola brevemente en metanol. Evite el contacto del metanol con la extensión gruesa; el metanol y sus vapores la fijarían rápidamente y no se teñiría bien.
2. En un tubo de ensayo o un envase pequeño, prepare una solución de Giemsa al 10% en solución amortiguadora, mezclando tres gotas de colorante de Giemsa (sacadas de la solución madre con una pipeta de Pasteur) con 1 ml de solución amortiguadora. Para cubrir un portaobjetos se necesitan aproximadamente 3 ml de colorante.
3. Según lo que esté utilizando (bandeja, placa o gradilla de tinción), coloque los portaobjetos que vaya a teñir boca abajo en la bandeja de tinción curva, o boca arriba en la placa o gradilla.
4. Vierta el colorante poco a poco en la bandeja de tinción hasta que cubra todos los portaobjetos o viértalo poco a poco sobre los portaobjetos puestos boca arriba en la placa o gradilla.
5. Tiña las extensiones durante unos 8 a 10 minutos. La experiencia que vaya adquiriendo con el colorante que utilice le ayudará a decidir exactamente cuánto tiempo necesita para una buena tinción.
6. Aclare el colorante del portaobjetos añadiendo agua gota a gota. No elimine el colorante vertiéndolo directamente de los portaobjetos porque la capa superficial verde metalizado se adheriría a la extensión, dejándola inutilizable para el examen microscópico.
7. Cuando haya eliminado el colorante coloque los portaobjetos en la gradilla de secado, con la extensión hacia abajo, para que se sequen. Tenga cuidado para que las extensiones gruesas no rocen con los bordes de la gradilla.

**El método lento (al 3%)**

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

***Necesitará:***

- Colorante de Giemsa;
- Metanol;[2]
- Algodón absorbente;
- Cubetas de tinción para 20 portaobjetos;
- Solución amortiguadora con un pH de 7,2;
- Una probeta graduada de 100–500 ml;
- Una probeta graduada de 10–25 ml;

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

Documento Derogado

- Un frasco o vaso de precipitado cuya capacidad dependerá de la cantidad de colorante que se vaya a preparar;
- Un cronómetro
- Una gradilla de secado de las extensiones.

***El método:***

1. Fije las extensiones finas o frotis sumergiéndolas en metanol durante unos segundos. Evite el contacto del metanol con la extensión gruesa; el metanol y sus vapores la fijarían rápidamente y no se teñiría bien.
2. Coloque los portaobjetos secuencialmente en una cubeta de tinción, asegurándose de que las extensiones gruesas miran todas hacia uno de los extremos de la cubeta.
3. Prepare una solución de Giemsa al 3% añadiendo 3 ml de la solución madre del colorante a 97 ml de solución amortiguadora con un pH de 7,2 (o múltiplos de esos volúmenes).
4. Vierta el colorante en la cubeta. No lo vierta directamente en las extensiones gruesas, pues podrían desprenderse del portaobjetos.
5. Mantenga el proceso de tinción durante 45 a 60 min.; la experiencia le enseñará cuál es la duración correcta.
6. Vierta suavemente agua en la cubeta haciendo que la capa iridiscente flote. Para evitar alteraciones de las extensiones gruesas, vierta el agua en el extremo donde se encuentran las extensiones finas. Otra forma menos satisfactoria de enjuagar los portaobjetos consiste en introducir la cubeta en un frasco lleno de agua limpia y después retirarla evitando traer junto con ella la capa iridiscente.
7. Descarte suavemente el colorante restante y enjuague con agua limpia.
8. Retire cuidadosamente las preparaciones, una por una, y colóquelas con la extensión hacia abajo en la gradilla de secado. Tenga cuidado para que las extensiones gruesas no rocen con los bordes de la gradilla.

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

### 5.4.9. Fuentes de error

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

### 5.4.10. Observación microscópica

En la gota gruesa el fondo debe observarse limpio, exento de residuos y los parásitos deben encontrarse en forma libre. Los núcleos de los leucocitos o glóbulos blancos deben aparecer teñidos de un color púrpura oscuro intenso y los parásitos deben verse con la cromatina de color rojo oscuro y el citoplasma azul purpúreo pálido, en el frotis, se observan los leucocitos completos (núcleo y citoplasma) y los

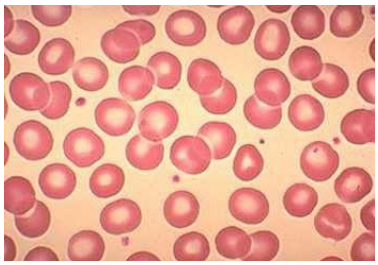
Documento Derogado

parásitos se encuentran intracelulares en los glóbulos rojos o eritrocitos (ver Fig. 5.7). El pigmento malárico se tiñe color pardo-amarillo.

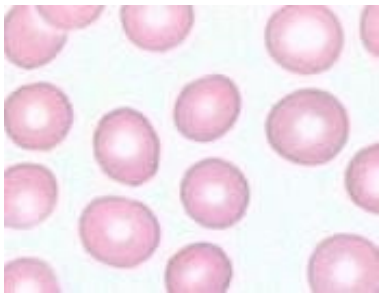
### 5.4.11. Elementos formes de la sangre

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

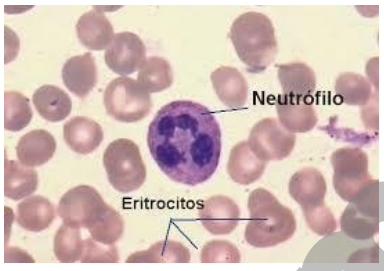
**Figura 5.8 Elementos formes de la sangre**



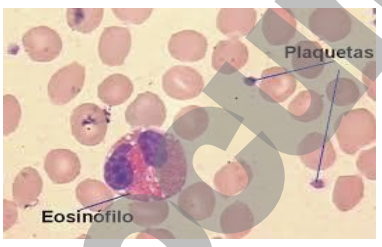
**Eritrocitos o glóbulos rojos:** Los glóbulos rojos tienen una forma de disco bicóncavo, es la célula más común que se encuentra en el frotis, hay cerca de 5,000,000 de glóbulos rojos por cada microlitro de sangre, con una buena coloración de Giemsa, los glóbulos rojos, que miden aproximadamente 7.5 µm de diámetro y no tienen núcleo, se colorean rosa-grisáceo pálido. Sin embargo, algunas células inmaduras pueden contener material que se colorea diferente y parecen más grandes que los glóbulos rojos normales. Estos se denominan reticulocitos.



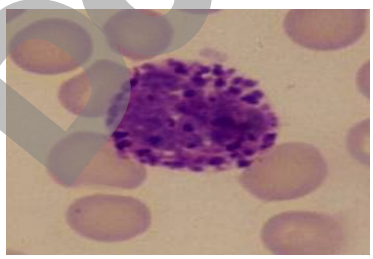
**Leucocitos o glóbulos blancos:** El número total de leucocitos por microlitro de sangre oscila entre 6,000 y 8,000 células. Existen diferentes tipos de leucocitos los cuales se colorean de manera diferenciada, en el extendido fino se les puede reconocer el núcleo, el citoplasma y la membrana celular,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




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

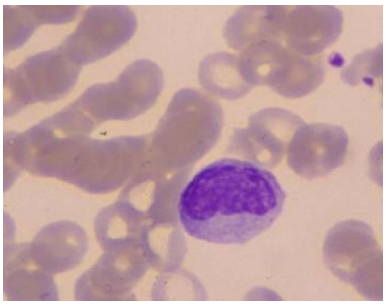



**Eosinófilo:** Este posee un núcleo segmentado no más de dos a tres lóbulos y su citoplasma está lleno por completo de gránulos color anaranjado.

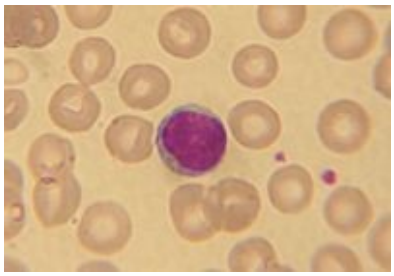


**Basófilo**: Tienen un núcleo bilobulado con gránulos superpuestos que se tiñen de negro púrpura.

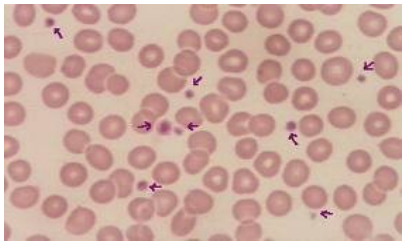
Documento Deroqado



**Monocito**: Célula de mayor tamaño en sangre periférica (con un promedio de 18µm), posee un núcleo con forma de riñón o frijol y el citoplasma es bastante delicado y a veces puede contener en poca cantidad gránulos de color rosado o rojo.



**Linfocito:** Tiene una variación de tamaño, todo depende de la cantidad de citoplasma presente, su núcleo tiene más o menos el tamaño de un eritrocito y su cromatina se condensa y se tiñe de color púrpura intenso, rodeado por un escaso citoplasma tenido de color azul cielo.



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

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

### 5.4.12. Elementos formes de la sangre en la gota gruesa

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

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

### 5.4.13. Elementos formes de la sangre en un frotis

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

- Eritrocitos o Glóbulos Rojos
- Leucocitos o Glóbulos Blancos
- Plaquetas.

### 5.4.14. Características morfológicas de *Plasmodium*

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

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

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

Documento Derogado

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

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

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

### 5.4.15. Estadíos de los *Plasmodium*

**a) Trofozoíto**

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

**b) Esquizonte**

En este estadio el parásito empieza a reproducirse, esta reproducción se le denomina asexual por que el parasito no es hembra ni macho pero se reproduce por simple división celular. Hay varias fases en este estadio: desde parásitos con dos fragmentos de cromatina hasta aquellos con muchos puntos de cromatina y citoplasma definido.

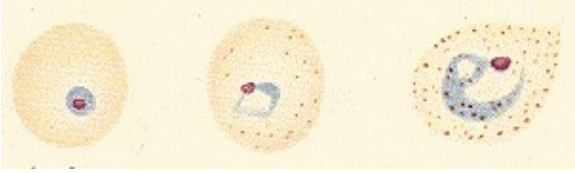
Al proceso de formación de esquizontes en la sangre se le llama **esquizonte sanguíneo** y en el hígado **esquizonte tisular** se le denomina esquizogonia.

**c) Gametocito.**

Es el estadio sexual en el cual el parásito se convierte en hembra o macho preparándose para la siguiente fase que ocurre en el estomagó del mosquito hembra del género Anopheles, los gametocitos pueden tener forma redonda o forma de banano o luna creciente, dependiendo de la especie. La forma en que el parásito se colorea, permite identificar si es un gametocito hembra macrogametocito o macho microgametocito.

Documento Derogado

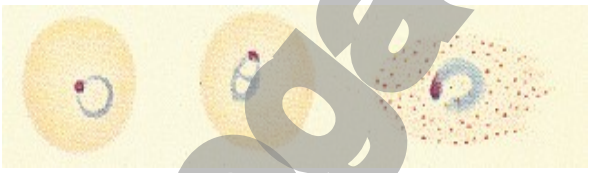
**Figura 5.9: Estadíos de los *Plasmodium***



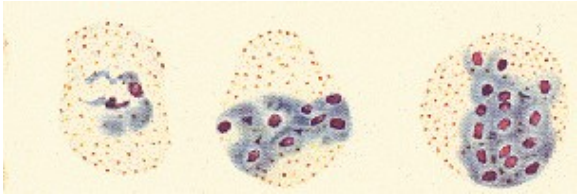
Trofozoíto de *P. vivax* – anillo joven, maduro, trofozoíto

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

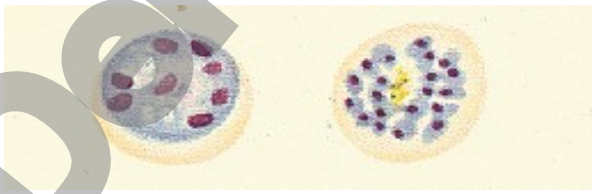
Trofozoíto de *P. malarie* – Forma anillo, banda temprana, banda



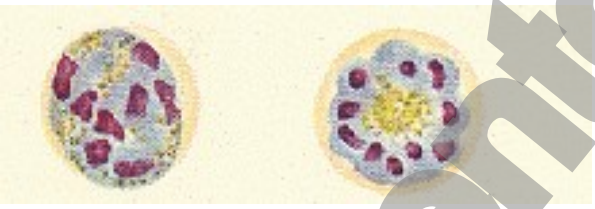
Trofozoíto de *P. ovale* – *Anillo* joven, viejo, forma de cometa



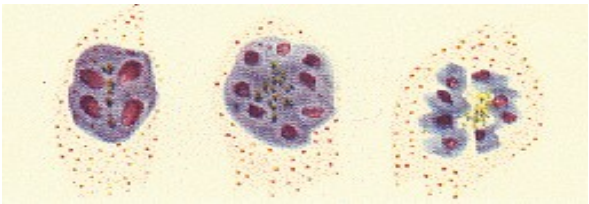
Esquizontes de *P. vivax* – temprano, Esquizonte, maduro



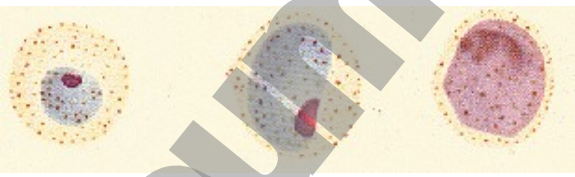
Esquizonte de *P. falcipaum* – Esquizonte, maduro



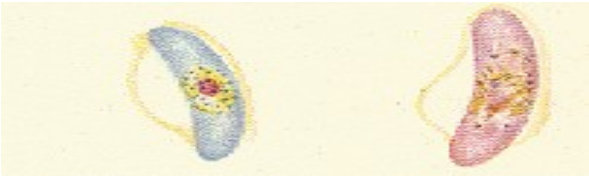
Esquizonte de *P. malarie* – Temprano, maduro



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

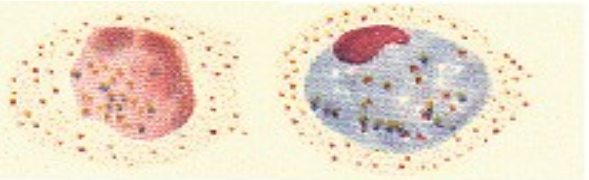


Gametocito de *P. vivax* – temprano, femenino, masculino



Gametocito de *P. falcipaum* – femenino, masculino

Gametocito de *P. malarie* - femenino



Gametocito de *P. ovale* – femenino, masculino

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

Documento Derogado

### 5.4.16. Especies causantes de malaria

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

Para identificar las cuatro especies de *Plasmodium* que parasitan a los seres humanos, se deben reconocer sus características morfológicas en sus diferentes estadios de desarrollo (gota gruesa y frotis) y su efecto sobre los glóbulos rojos parasitados (frotis).

*Plasmodium falciparum* es la especie más frecuente en las zonas tropicales y es la causante de la mayoría de los casos graves y mortales de paludismo.
*Plasmodium vivax* es la especie más frecuente en las zonas más frías de los trópicos. Son los *Plasmodium* humanos más grandes y son una importante causa de absentismo laboral y escolar.

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

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

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

| Parásito | Estadío | Morfología del eritrocito | Morfología del Parásito |
|---|---|---|---|
| *P. vivax* | Anillo | Normal - 1 ¼ de veces más grande; redondo; ocasionalmente punteado de Schüffner fino. Infección múltiple del eritrocito no es infrecuente. | Citoplasma grande con pseudópodos ocasionales; punto grande de cromatina. |
| | Trofozoíto | Agrandado de 1 ½ a 2 veces, puede estar distorsionado. Punteado de Schüffner fino. | Citoplasma ameboideo grande; cromatina grande; pigmento fino café - amarillo. |
| | Esquizonte | Agrandado de 1 ½ a 2 veces, puede estar distorsionado. Punteado de Schüffner fino. | Grande, puede llenar todo el eritrocito; esquizonte maduro con 12-24 merozoitos; pigmento café-amarillo convergente. |
| | Gametocito | Agrandado de 1 ½ a 2 veces, puede estar distorsionado. Punteado de Schüffner fino. | Redondo a oval; compacto; puede casi llenar el eritrocito; cromatina difusa (Microgametocito) o compacta y excéntrica (Macrogametocito). Pigmento café disperso. |
| *P. falciparum* | Anillo | Normal; infección múltiple puede encontrarse más comúnmente que en las otras especies. | Citoplasma delicado; 1-2 puntos pequeños de cromatina; ocasionalmente se observan formas marginales. |
| | Trofozoíto* | Normal; raramente, fisuras de Maurer (según las condiciones de la coloración) | Muy raramente se observan en circulación; citoplasma compacto; pigmento oscuro. |
| | Esquizonte* | Normal; raramente, fisuras de Maurer (según las condiciones de la coloración) | Muy raramente se observan en circulación. En el maduro 12-30 merozoitos pequeños, pigmento oscuro agrupado en una masa. |
| | Gametocito | Distorsionado por el parásito | Forma de luna creciente o salchicha; cromatina difusa (Microgametocito) o en una sola masa (Macrogametocito). Masa de pigmento oscuro. |

Documento Derogado

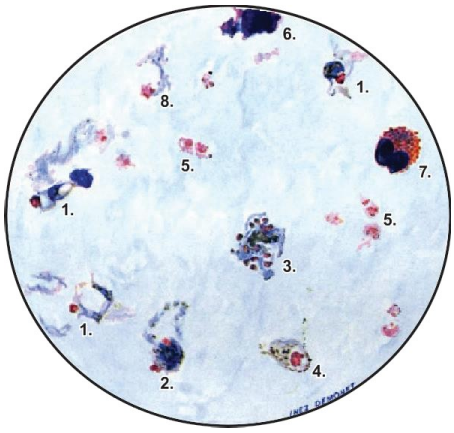
| | | | |
|---|---|---|---|
| *P. malariae* | Anillo | Normal a ¾ de su tamaño. | Citoplasma grueso; cromatina grande. |
| | Trofozoíto | Normal a ¾ de su tamaño, ocasionalmente punteado de Ziemman (según coloración). | Citoplasma compacto; cromatina grande; pigmento grueso, café oscuro. Ocasionalmente formas en banda. |
| | Esquizonte | Normal a ¾ de su tamaño, ocasionalmente punteado de Ziemman (según coloración). | Gametocito maduro con 6-12 merozoítos con núcleos grandes alrededor de una masa de pigmento café oscuro, ocasionalmente formas en "margarita". |
| | Gametocito | Normal a ¾ de su tamaño, ocasionalmente punteado de Ziemman (según coloración). | Redondo a oval; compacto; casi llena el eritrocito, cromatina difusa (Microgametocitos) o compacta y excéntrica (Macrogametocito). Pigmento café disperso. |
| *P. ovale* | Anillo | Normal - 1¼ veces más grande; redondo a ovalado; ocasionalmente punteado de Schuffner; ocasionalmente fimbriado; infección múltiple del eritrocito no es infrecuente. | Citoplasma grueso; cromatina grande |
| | Trofozoito* | Normal - 1¼ veces más grande; redondo a ovalado; algunos fiambrados; punteado de Schuffner. | Compacto con cromatina gruesa; pigmento café oscuro. |

**Fuente: División de Enfermedades Parasitarias CDC Atlanta**

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

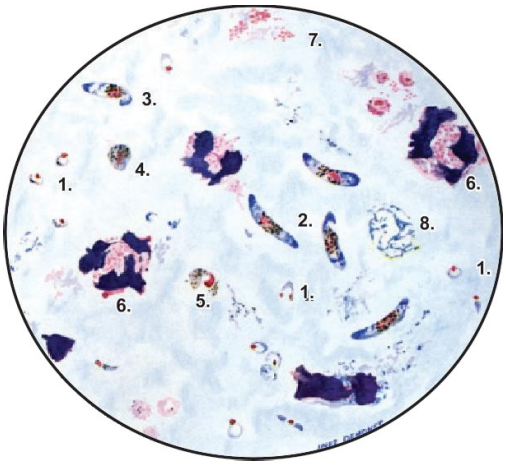
**A. *Plasmodium* vivax**

1. Trofozoíto anular o anillo
2. Esquizontes con dos fragmentos de cromatina
3. Esquizonte maduro
4. Gametocito
5. Plaquetas
6. Neutrófilo
7. Eosinófilo
8. Plaqueta asociada a restos de un glóbulo rojo joven




**B. *Plasmodium* falciparum**

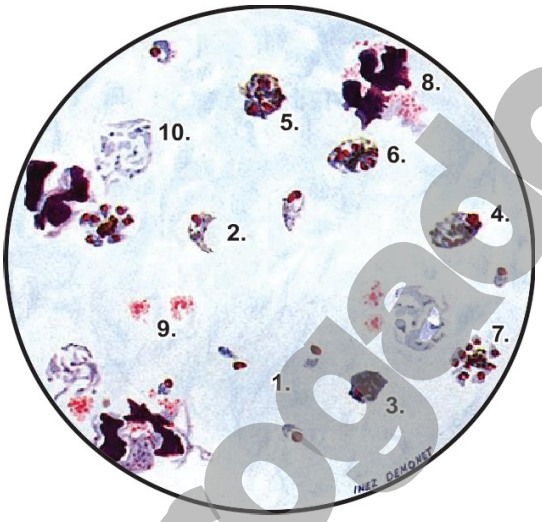
1. Trofozoíto anular o anillo
2. Gametocitos normales
3. Gametocito levemente distorsionado
4. Gametocito enrollado
5. Gametocito desintegrado
6. Leucocito polimorfo nuclear
7. Plaquetas
8. Restos de glóbulo rojo joven




Documento Derogado

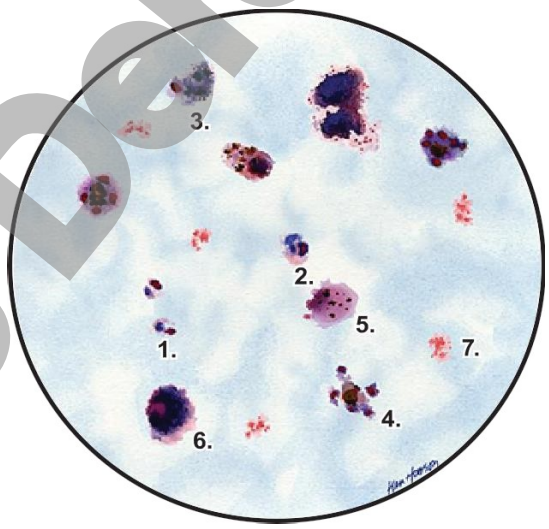
**C.** ***Plasmodium*** **malariae**

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




**D.** ***Plasmodium*** **ovale**

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

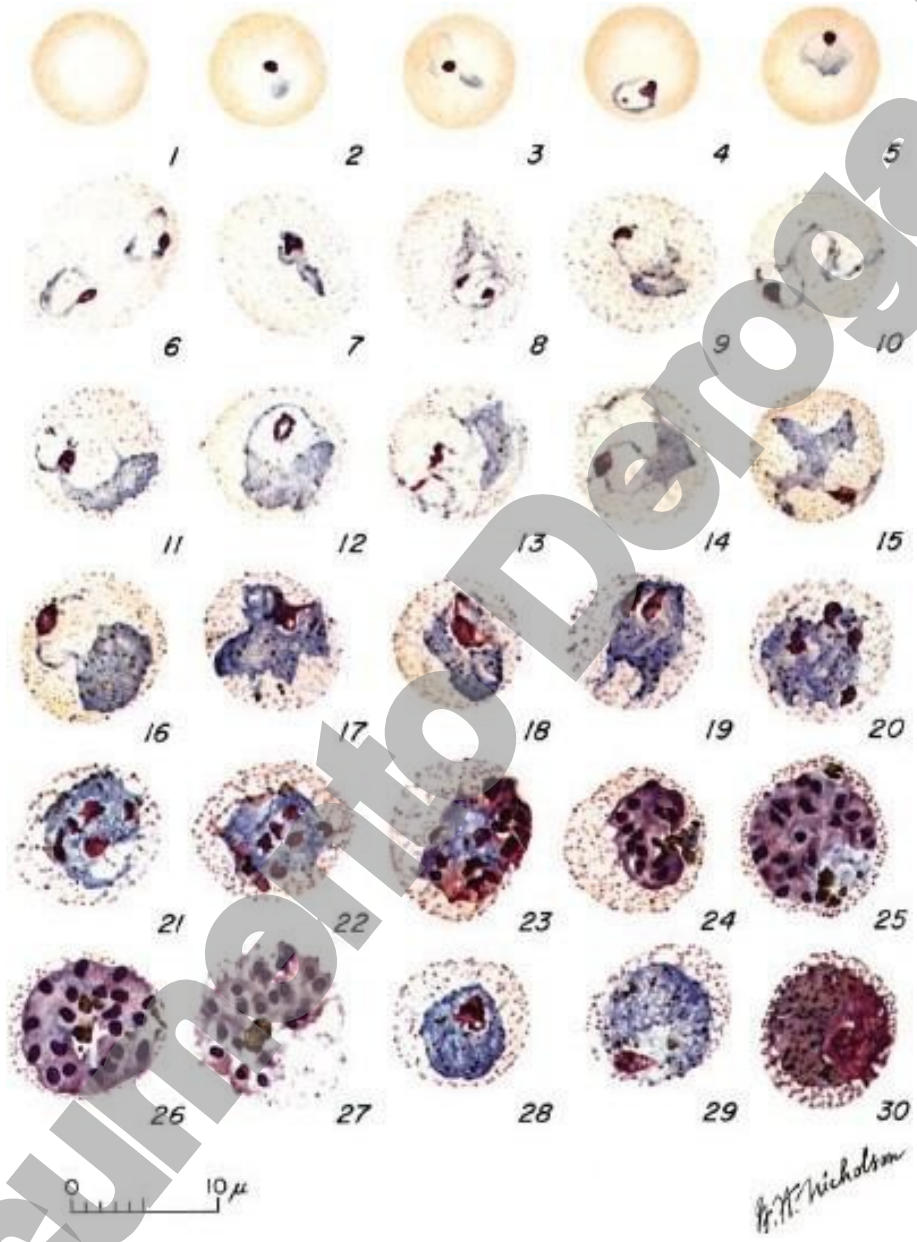



*Fuente: Laboratorio Nacional de Salud Pública de El Salvador, MINSAL*

Documento Derogado

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

*Plasmodium* **vivax**

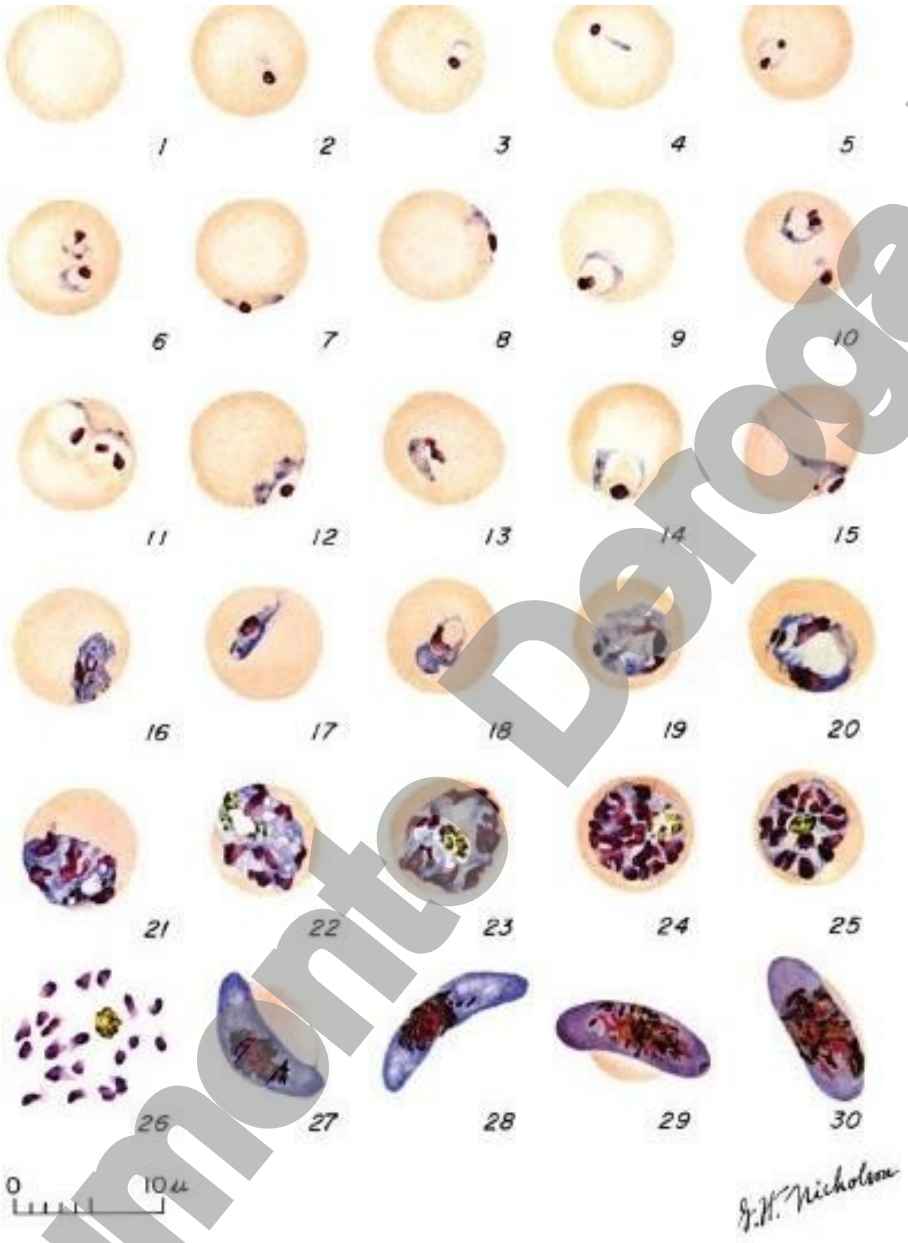



1. Glóbulo rojo normal
2-10. Trofozoítos em forma anular o anillos
11-18. Trofozoítos inmaduros
19-26. Esquizontes
27-28. Gametocitos maduros (macrogametocito o hembra)
29-30. Gametocito maduro (microgametocito o macho)

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

Documento Derogado

*Plasmodium* **falciparum**




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

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

Documento Derogado

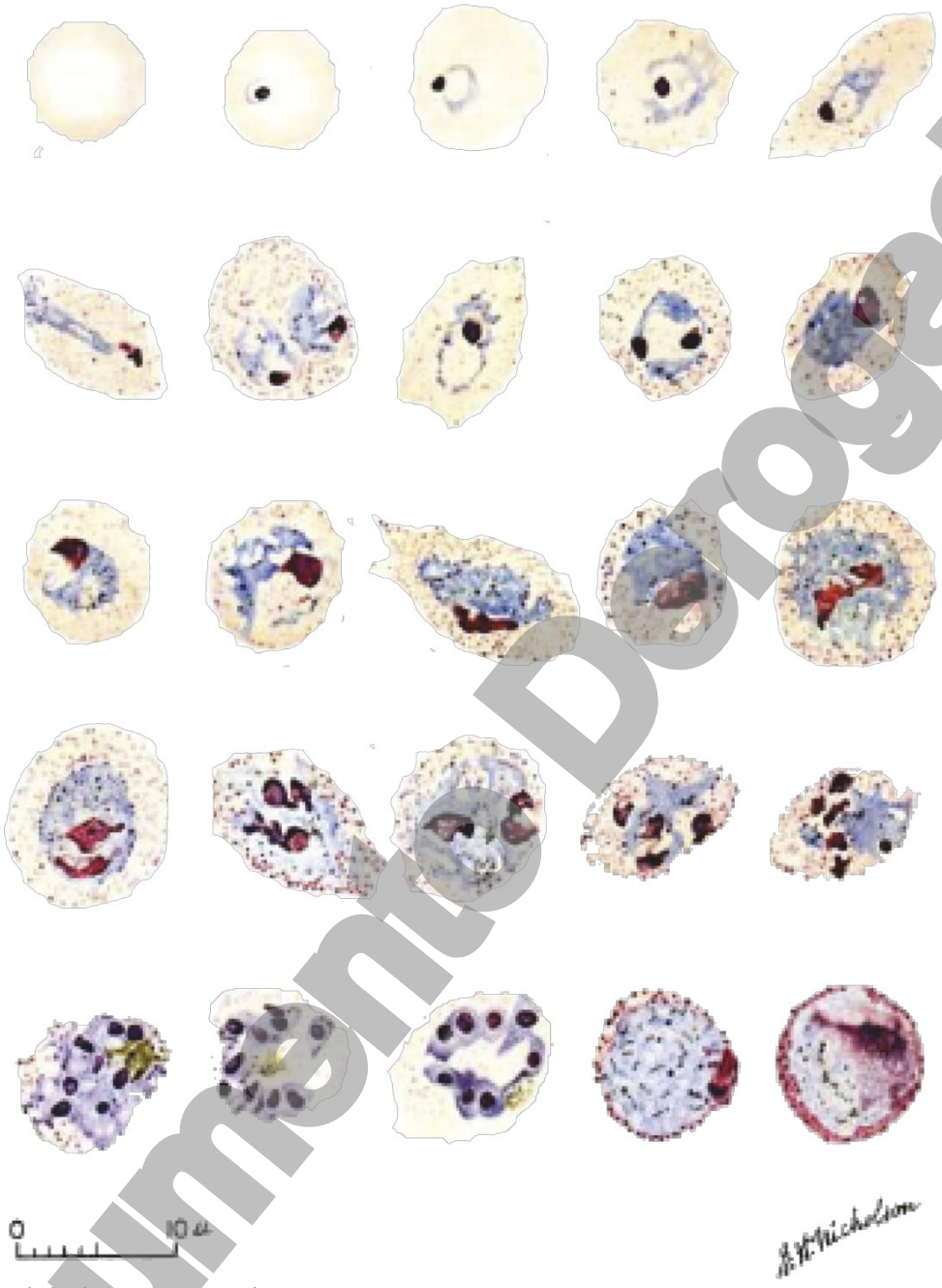
*Plasmodium* **malariae**

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

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

Documento Derogado

*Plasmodium* **ovale**

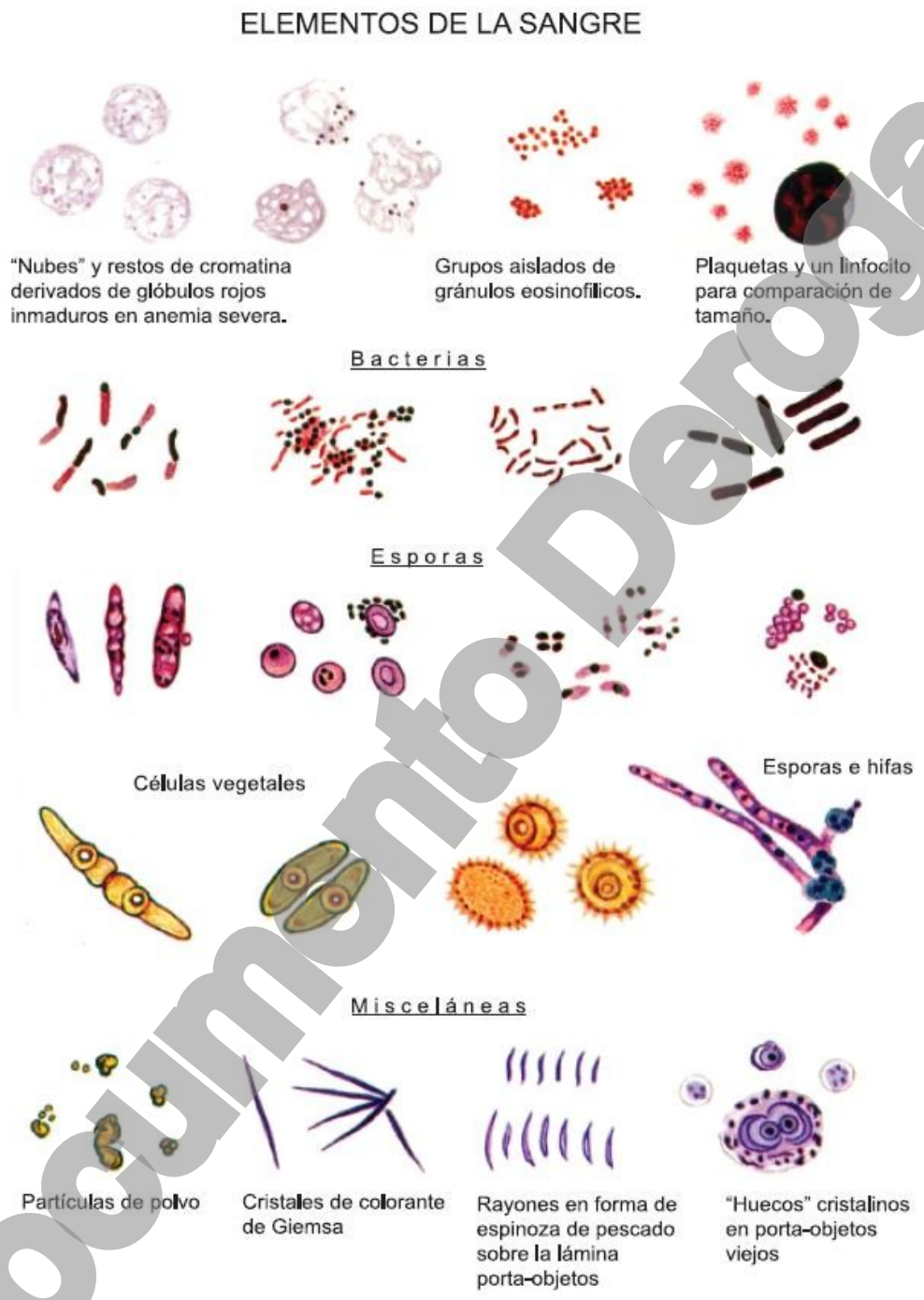



1. Glóbulo rojo normal
2-5. Trofozoíto en forma anular o anillos
6-15. Trofozoíto
16-23. Esquizonte
24. Macrogametocito (hembra)
25. Microgametocito (macho)

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

Documento Derogado

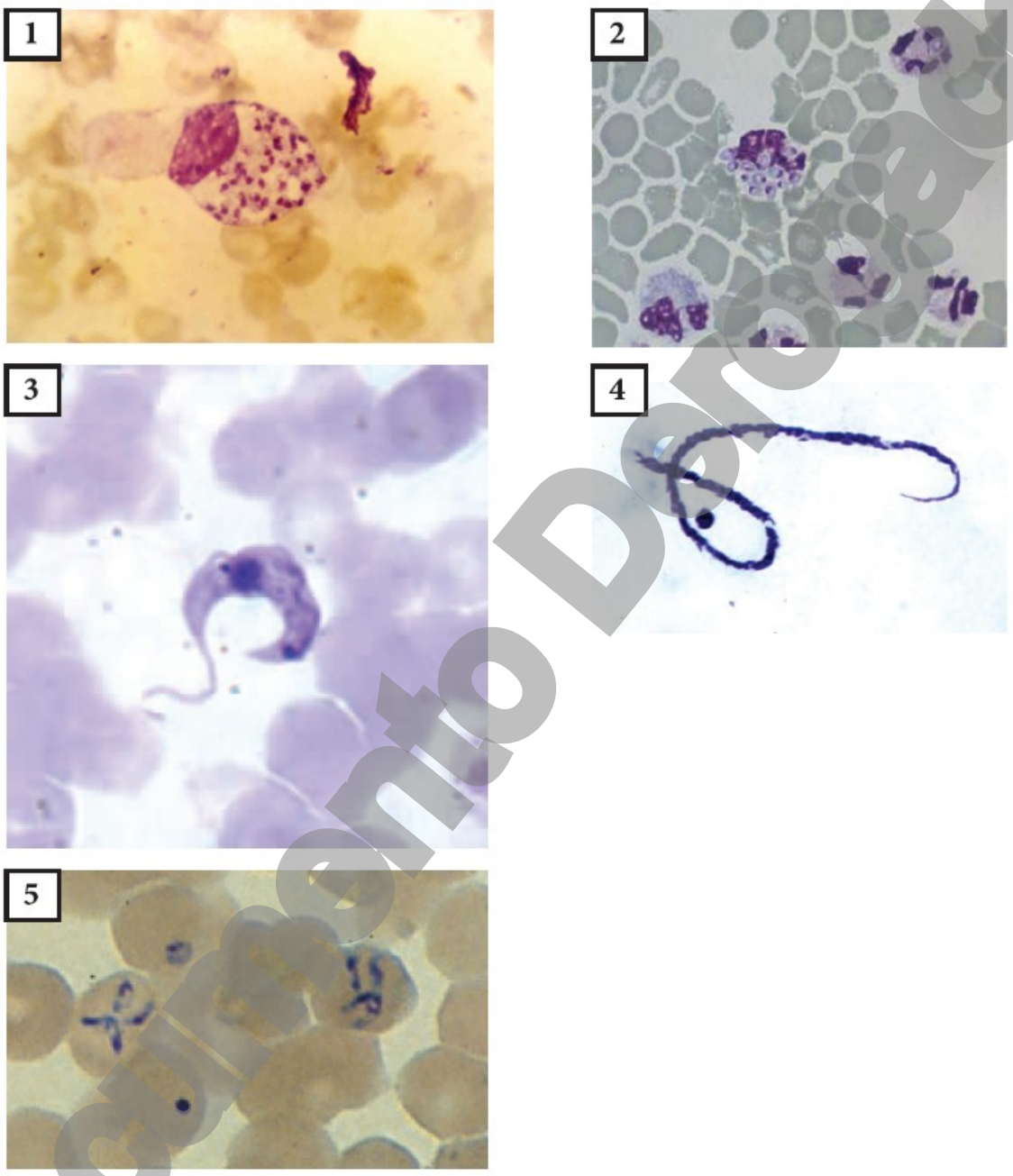
**Figura 5.12 Artefactos que se pueden encontrar en la observación microscópica de muestras de sangre**




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

Documento Derogado

**Figura 5.13: Microorganismos que se pueden encontrar en la observación microscópica de muestras de sangre: amastigotes de Leishmania (1), levaduras de Histoplasma (2), tripomastigotes de T. cruzi (3), microfilarias (4) y Babesia (5**




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

Documento Derogado

### 5.4.17. Examen de las extensiones sanguíneas

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

Para observar el equivalente de 100 campos de gota gruesa (objetivo de inmersión), tendríamos que observar de 2000 a 3000 campos en el extendido del frotis, por lo tanto, no se recomienda la observación microscópica del frotis como una práctica rutinaria en el diagnóstico microscópico de la malaria. Se recomienda la observación del frotis en las siguientes situaciones:

a) La gota gruesa es inadecuada o no se cuenta con una gota gruesa
b) Es necesario confirmar la especie de *Plasmodium*

#### 5.4.17.1 Técnica de examen microscópico de la gota gruesa

En general, siempre que la gota gruesa esté bien preparada y coloreada, no debe haber dificultad en la identificación de las especies de *Plasmodium* presentes. La microscopía basada en la tinción de Giemsa es extremadamente sensible y el examinador experimentado puede detectar *Plasmodium* cuando su densidad es de tan solo 5 a 10 por microlitro de sangre.

**Equipo:**

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

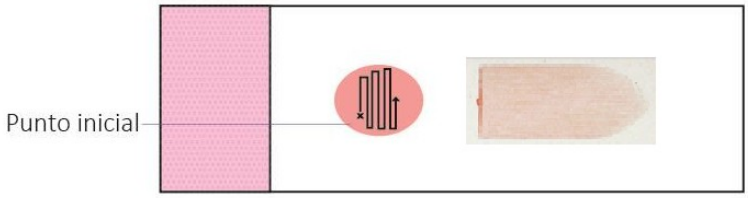
**Materiales – Reactivos:**

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

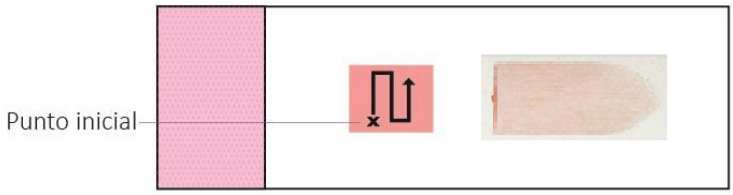
**Procedimiento:**

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

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




Documento Derogado




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

5) Examinar toda la muestra sistemáticamente en busca de parásitos presentes.
6) Si no hay parásitos en toda la muestra examinada se considerará negativa.
7) Si la muestra es positiva y se ha identificado la especie, determinar la densidad parasitaria.
8) Terminar el examen registrando los resultados que se hayan obtenido en el formulario (o formularios) apropiados.
9) Eliminar completamente el aceite de inmersión de la preparación, limpiando de forma suave la muestra y guarde la preparación en una caja portaláminas.
10) Limpiar suavemente el objetivo de inmersión.

**5.4.17.2. Técnica de examen microscópico de frotis**

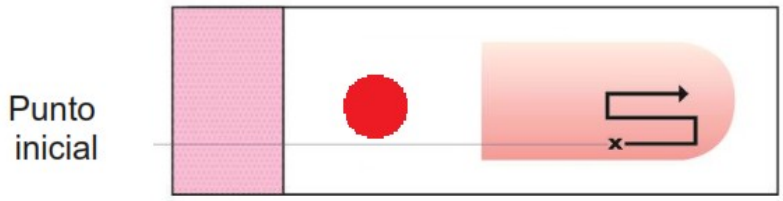
Los frotis no se examinan de forma sistemática para establecer el diagnóstico en un paciente, el examen del frotis se recomienda cuando la extensión gruesa es demasiado pequeña, se perdió la muestra en la coloración y no es examinable, cuando la confirmación de la especie en la gota gruesa resulta difícil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

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

**Procedimiento:**

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

**Figura 5.15 Lectura de frotis, con objetivo de 100 X**




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

Documento Derogado

## 5.5. Densidad parasitaria

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

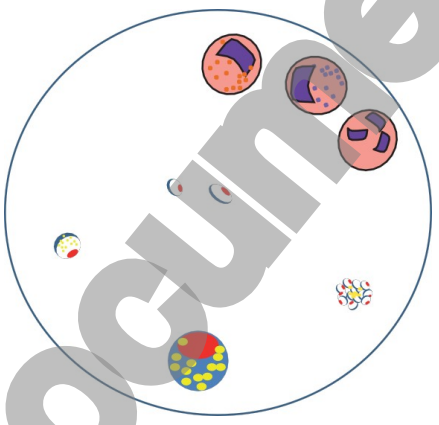
Al determinar la parasitemia, se debe informar de manera independiente los estadios asexuales (anillos, trofozoítos y esquizontes) y los estadios sexuales (gametocitos), esto es así, debido a que los estadios asexuales son los responsables de las manifestaciones clínicas y complicaciones, el método utilizado para determinar la densidad parasitaria es un método cuantitativo que permite estimar la parasitemia en la gota gruesa y en el frotis, que se informa como número de parásitos contados en 200 leucocitos para la gota gruesa o porcentaje de glóbulos rojos parasitados en el frotis, tanto en la gota gruesa como en el frotis, 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. Estos pasos se efectúan cuando se haya completado el examen de la extensión y se hayan identificado las fases de los parásitos y sus especies.

### 5.5.1 Conteo de la gota gruesa

Iniciar el conteo, registrar por separado parásitos asexuales, parásitos sexuales, y glóbulos blancos, solo ingresar al conteo los parásitos que están dentro del campo microscópico y los glóbulos blancos bien definidos. Ejecutar primera, segunda lectura y promediar, la diferencia de ambas lecturas no debe ser mayor de 50%.

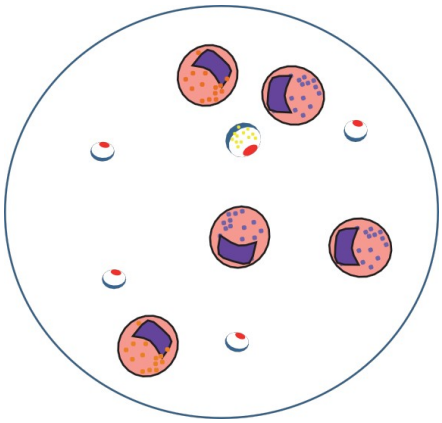
**Figura 5.16 Ejemplo conteo de la gota gruesa**

*Campos microscópico N° 1*



Campo 1
EAS: 4 (2 anillos, 1trofozoíto, 1 esquizonte)
ESS: 1 (1 gametocito)
Leucocitos: 3

*Campo microscópico N° 2*



Campo 2
EAS: 5 (4 anillos, 1 trofozoíto)
ESS: 0 (0 gametocito)
Leucocitos: 5

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

Documento Derogado

### 5.5.2 Método por determinación de parásitos por microlitro de sangre

Se mide comparando el número de parásitos asexuales y sexuales con el número de glóbulos blancos en la gota gruesa en base a un recuento medio razonable, en muestras obtenidas sucesivamente de estimado en cerca de 6000 leucocitos por microlitro de sangre.

Permite comparaciones del mismo paciente (control de los pacientes en los días posteriores a su diagnóstico).
Se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$\textbf{Parásitos / µL} = \frac{\textbf{N° de parásitos}}{\textbf{N de leucocitos}} \times 6000$$

N° de parásitos = Número de parásitos contados
N° de leucocitos = Número de leucocitos contados
ul = microlitro

### 5.5.3 Procedimiento de la determinación de parásitos por microlitro de sangre (gota gruesa).

- Se debe tener el conteo de glóbulos rojos y blancos.
- En el caso de no contar estos datos se asumen concentraciones constantes 5,000,000/µl sangre y 6,000-8,000 leucocitos/µl sangre

Después de haber completado el examen de la extensión e identificando las fases de los parásitos y sus especies, se procede a contar leucocitos y parásitos simultáneamente.
**Densidad parasitaria método cuantitativo en gota gruesa conteo por leucocitos.**

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

0 parásitos → contar hasta 500 campos
1-9 parásitos → contar hasta 500 leucocitos
10 a más parásitos → contar hasta 200 leucocitos

Doble de parásitos en comparación con leucocitos, esto es igual al número de leucocitos contados hasta 500 parásitos

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

*Tabla 5.2. Densidad parasitaria estimada por leucocitos y por microlitro de sangre, gota gruesa y frotis*

| Densidad | /100 | *P. falciparum* Leucocitos/microlitro | /100 | *P. vivax* leucócitos/microlitro |
|---|---|---|---|---|
| Baja | < 10 | < 800 | < 10 | < 800 |
| Moderada | 10 – 50 | 800-4000 | 10-30 | 800-2400 |
| Alta | > 50 | > 4000 | > 30 | > 2400 |

*Fuente:* Fox E and GT Strickland, 1989

Documento Derogado

### 5.5.4 informe de resultados e interpretación

La malaria no se descarta con un resultado de gota gruesa negativo, cuando se está examinando un paciente individual de quien se posee evidencia clínica y epidemiológica de malaria, es necesario tomar una o dos muestras adicionales si la primera gota gruesa es negativa. Las muestras adicionales se deben tomar durante o inmediatamente después de la fiebre, esta recomendación es para *P. falciparum* en cuya infección solamente circulan los estadíos más jóvenes (anillos), después de la ruptura del esquizonte (asociada a la fiebre), y los gametocitos. Los estadíos de *P. vivax* siempre circulan, el resultado de la observación microscópica se debe informar en el formulario respectivo y no debe ser escrito sobre la lámina para no alterar el control de calidad.

### 5.5.5 Reporte de resultados

**Resultado negativo:** es cuando la observación de 500 campos en gota gruesa no ha permitido identificar parásitos, el informe se escribe así: No se observó *Plasmodium spp.* en 500 campos.

**Resultado positivo**: es cuando se observa una gota gruesa o un extendido en donde se evidencia la presencia de varios parásitos de *Plasmodium spp.*, se debe de informar mediante sistema cuantitativo (identificación de género, la especie, estadíos y la densidad)

### 5.5.6 Identificación de la especie de *Plasmodium spp* y abreviaturas

Pv: *Plasmodium vivax*
Pf: *Plasmodium falciparum*
Infección mixta: *P. vivax y P. falciparum*
V = Estadios asexuales de *P. vivax*
Vg = Gametocitos de *P. vivax*
V y Vg = Estadios asexuales y gametocitos de *P. vivax*
F = Estadios asexuales de *P, falciparum*
Fg = Gametocitos de *P. falciparum*
F y Fg = Estadios asexuales y gametocitos de *P. falciparum*
V y F = Infección mixta de *P. vivax* con *P.falciparum.*
N = Negativo

### 5.5.7 Estadios presentes

- Estadios Asexuales Sanguíneos (EAS): anillos, trofozoítos jóvenes, trofozoítos maduros y esquizontes.
- Estadios Sexuales Sanguíneos (ESS): gametocitos

### 5.5.8 Densidad parasitaria

N° EAS + N° ESS o gametocitos / N° leucocitos contados

### 5.5.9 Reporte de resultados

**Ejemplo Reporte de *Plasmodium vivax:***

*Pv 67 EAS + 23 ESS / 201 leucocitos*
*Pv 325 EAS + 45 ESS/56 leucocitos*
*Pv 4 EAS/510 leucocitos*

**Ejemplo Reporte de *Plasmodium falciparum:***

*Pf 3 EAS, 14 ESS/ 510 Leucocitos*
*Pf 567 EAS/ 58 leucocitos*
*Pf 45 EAS, 4 ESS / 201 leucocito*

Documento Derogado

### 5.5.10 Reporte de Infecciones mixtas

*Inf. Mixta: Pv 10 EAS/503 leucocitos y Pf 178 EAS, 1*

**Ejemplos de reportes:**

Conteo por leucocitos: 5 EAS + 4 ESS en 500 leucocitos
Parásitos por microlitro: 60 EAS + 48 ESS
Conteo por leucocitos: 10 EAS + 13 ESS en 200 leucocitos
Parásitos por microlitro: 300EAS + 390 ESS
Conteo por leucocitos: 489EAS + 11 ESS en 13 leucocitos
Parásitos por microlitro: 225,696EAS + 5,076 ESS
Conteo por leucocitos: 15 EAS + 1 ESS en 200 leucocitos
Parásitos por microlitro: 450 EAS + 30 ESS
Conteo por leucocitos: 325 EAS + 175 ESS en 20 leucocitos
Parásitos por microlitro: 97,500 EAS + 52,500 ESS
Conteo por leucocitos: 8EAS + 1 ESS en 500 leucocitos
Parásitos por microlitro: 96 EAS + 12 ESS

### 5.5.11 Sistema de reporte

**Tabla 5.3. Densidad parasitaria estimada por leucocitos y por microlitro de sangre, gota gruesa y frotis**

| Sistema Cuantitativo | |
|---|---|
| Leucocitos | Parásitos/ microlitro sangre |
| *P. vivax* 125 EAS+ 10 ESS/ 203 leucocitos | *P. vivax* 3694 EAS + 295 ESS p/µl |
| *P. falciparum* 728 EAS+ 0 ESS/ 56 leucocitos | *P. falciparum* 78000 EAS+ o ESS p/µl |
| Infx Mixta *P. vivax* 178 EAS+ 24 ESS/ 203 leucocitos<br>*P. falciparum* 25 EAS + 10 ESS/ 215 Leucocitos | *P. vivax* 5261 EAS + 709 ESS p/µl<br>*P. falciparum* 697 ESS + 279 ESS p/ µl |

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

## 5.6 Limpieza y almacenamiento de los portaobjetos para el diagnóstico microscópico de malaria

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

Para el diagnóstico microscópico de Malaria se prefieren los portaobjetos de vidrio de calidad «superior», con una banda mate para etiquetarlos, un portaobjeto de calidad «superior» hace que los portaobjetos no se vuelvan opacos en las condiciones existentes en los climas tropicales. Los portaobjetos de peor calidad son más baratos, pero se deterioran rápidamente en climas húmedos y calientes; el lavado no elimina las manchas opacas, y los portaobjetos se vuelven inutilizables para un examen microscópico preciso. ***Los***

Documento Derogado

***portaobjetos deben lavarse, secarse y envolverse adecuadamente,*** este proceso debe realizarse en todo establecimiento en el que se utilicen láminas portaobjetos.

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

### 5.6.1 Lavado y preparación de los portaobjetos nuevos

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

**Materiales Necesarios**

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

**Procedimiento:**

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

### 5.6.2 Lavado y preparación de los portaobjetos reciclados

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

**Materiales:**

- Portaobjetos reciclados;
- Recipientes de plástico de tamaño mediano;
- Un buen detergente líquido o en polvo; (detergente neutro extra liquido o detergente en polvo a un porcentaje del 3 %).

Documento Derogado

- Trapos de lavar o esponja suave;
- Paños de algodón limpios y que no dejen pelusas
- Frascos de boca ancha con tapa de rosca para poner el alcohol y los portaobjetos;
- Fuente de agua limpia.
- Hojas de papel limpio cortadas en rectángulos
- Cajas de portaobjetos vacías, como las de los portaobjetos nuevos;
- Rollo de tirro.

**Procedimiento:**

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

## 5.7. Control de calidad

Son las actividades que realiza constantemente el laboratorio para vigilar las operaciones y resultados, si son exactos y precisos para emitir el resultado.
El control de calidad del diagnóstico de la malaria es realizado por la red de laboratorios por medio de revisión de láminas diagnosticadas y evaluación externa del desempeño.

### 5.7.1 Control de Calidad Indirecto

Este control de calidad lo realiza el nivel central a través de la revisión de láminas diagnosticadas por los laboratorios de la red nacional correspondiente a cada semana.

#### 5.7.1.1 Procedimiento de láminas diagnosticadas y revisadas

En el Control de Calidad Indirecto los profesionales que realizan diagnóstico de malaria se deben enviar a control de calidad al LNSP el 10% de muestras diagnosticadas en forma semanal y el 100% de muestras positivas.
El envío semanal de láminas negativas al LNSP es cada viernes y los primeros dos días de inicio de semana de acuerdo a semana epidemiológica.

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

Documento Derogado

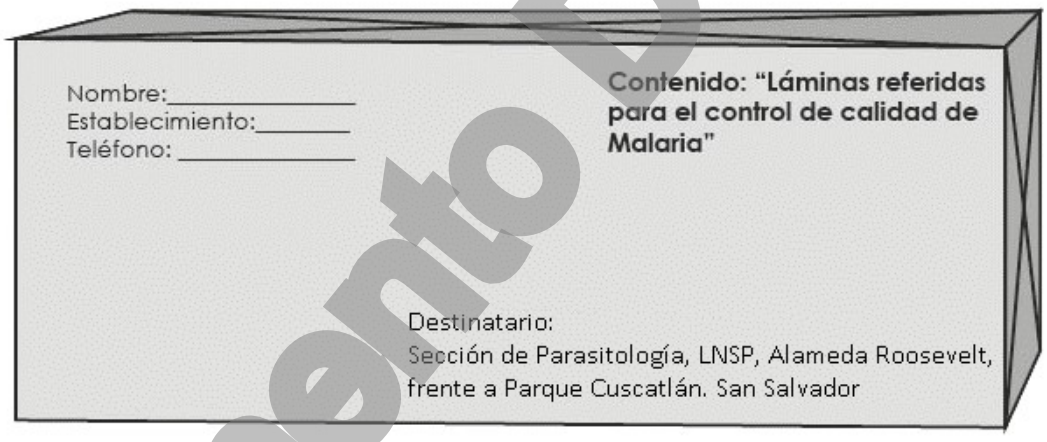
papel filtro se toma antes que el paciente sea medicado en los casos de Plasmodium falciparum. (Ver Anexo 9 para detalles sobre toma de muestra en papel filtro.)

### 5.7.1.2 Requisito del envío de láminas a control de calidad

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

**Remitente:** Se identifica con nombre del establecimiento de donde proceden las muestras y teléfono de contacto y nombre del responsable del envío.
**Destinatario:** Sección de Malaria, Laboratorio Nacional de Salud Pública, Alameda Roosevelt, Frente a parque Cuscatlán, San Salvador.
**Contenido:** Láminas referidas para el control de calidad de la malaria.

**Figura 5.17 Ejemplo de Paquete de láminas para el transporte de muestras referidas a Control de Calidad para el diagnóstico de la malaria**




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

**Parámetros de evaluación del control de calidad**

**a)** Calidad técnica de la muestra en la lámina, de acuerdo a los siguientes criterios: identificación, cantidad, tamaño, grosor y ubicación.
**b)** Calidad de la coloración: deshemoglobinización, tonalidad y elementos sanguíneos.
**c)** Forma de reporte.
**d)** Concordancia entre el resultado del evaluado y el evaluador.

### 5.7.1.3 Fuentes de error en la calidad técnica de la muestra

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

Documento Derogado

- Dilución incorrecta.
- Tiempos no normalizados de coloración.

**5.7.1.4 Informe de resultados del Control de Calidad Indirecto**

Si en el control de calidad se encuentran discordancias:

a) Se informa de inmediato al profesional responsable del error.
b) Se solicita la asistencia del profesional al LNSP para verificar y corregir.

Si los resultados son concordantes en el reporte:

a) El informe de resultados en físico es mensual.

**5.7.2 Evaluación Directa Externa- Nacional (Evaluación del Desempeño)**

Esta evaluación se realiza en todos los niveles de la red de laboratorios con una frecuencia de una vez al año, se evalúa la capacidad diagnóstica de los profesionales por medio de un panel de láminas analizadas y clasificadas por el personal de malaria del LNSP.

**5.7.2.1 Procedimiento**

- El LNSP con una periodicidad de una vez al año, envía a los profesionales que realizan el diagnóstico laboratorial de la malaria, un panel de láminas conteniendo muestras positivas o negativas a *Plasmodium.*
- Las láminas se envían con un código de identificación.
- Cada panel lleva un formulario donde el profesional evaluado emite sus resultados.
- El evaluado realiza y reporta de acuerdo a sus conocimientos:
  *a)* Presencia o no de *Plasmodium*
  *b)* Género, especie
  *c)* Estadíos
  *d)* Densidad parasitaria
- El profesional dispone de un plazo para enviar su reporte al supervisor del Laboratorio de su región, con su formulario de resultados y las láminas completas en sus respectivos portaláminas en el que fueron recibidos.
- Se evalúa la concordancia o discordancia entre el resultado del evaluado y el del LNSP de los parámetros antes mencionados.

**5.7.2.2 Informe de resultados**

El resultado de la evaluación del control de calidad de cada uno de los participantes se envía por medio del supervisor de laboratorio de cada región quien traslada el resultado a cada profesional. Así como también de brindar seguimiento en su región.

**5.7.3 Evaluación Externa del Desempeño- Internacional (PEED)**

El LNSP es objeto de evaluación por un laboratorio Internacional Especializado, por medio de un panel de láminas enviadas de acuerdo a especies circulantes en la región.

El reporte de resultados de los análisis realizados se realiza por vía electrónica al organismo internacional especializado responsable de la evaluación externa del desempeño en el plazo indicado a partir de la recepción de las muestras, de acuerdo al formato indicado en el momento de su envío.

El reporte final lo emite el organismo internacional responsable a organismos internacionales y jefaturas del LNSP.

Documento Derogado

## VI. Disposiciones finales

**a) Sanciones por el incumplimiento**

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

**b) Revisión y actualización**

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

**c) De lo no previsto**

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

## VII. Vigencia

Los presentes lineamientos técnicos entrarán en vigencia a partir de la fecha de la oficialización, por parte de la titular.

San Salvador, a los ocho días del mes de octubre de dos mil diecinueve

MINISTERIO DE SALUD SAN SALVADOR REP. DE EL SALVADOR, C.A.

**Dra. Ana del Carmen Orellana Bendek**

**Ministra de Salud**

Documento Derogado

## VIII. Glosario de términos

- **Agente infeccioso del paludismo:** parásito del género *plasmodium* de las especies *vivax, falciparum, malariae y ovale*

- **Anillo:** trofozoíto joven del plasmodio que consta de una vacuola grande rodeada por citoplasma y una masa de cromatina. Ocasionalmente, se observan dos masas de cromatina (esto se llama "fragmentación" de la cromatina y no representa división nuclear).
- **Esporogonia:** ciclo vital del plasmodio dentro del mosquito (reproducción sexual).

- **Esquizonte:** forma durante la cual ocurre división asexual.
- **Esquizogonia:** ciclo vital del *plasmodium sp.* Dentro del humano (reproducción asexual)

- **Esquizonte inmaduro:** estadío de la reproducción asexual del *plasmodium sp.*
- **Esquizonte maduro:** en este estadío del *plasmodium sp.,* la división del núcleo y citoplasma es completa. Se observan grupos de parásitos individuales llamados 'merozoitos'. Los gránulos de pigmento están más agrupados.

- **Gametocito:** célula sexual del *plasmodium* que se desarrolla dentro del eritrocito y permanece allí hasta que muere. Es el estado infeccioso para el mosquito; cuando se encuentra dentro de este se convierte en gameto.
- **Granulación:** granulaciones presentes en el citoplasma de los eritrocitos infectados; la granulación de shuffner es característica de infecciones con *p. Vivax* y *ovale.*
- **Macrogametocito**: célula sexual femenina del *plasmodium sp.*

- **Merozoito:** es el estadío de división asexual del *plasmodium sp.* Producido por división asexual (esquizogonia). Consiste de una masa de citoplasma y una única masa de cromatina.

- **Microgametocito:** célula sexual masculina del *plasmodium sp.*

- **Pigmento:** hematina producida como resultado de la digestión de la hemoglobina por los parásitos del *plasmodium sp.* Se observan partículas de pigmento en el citoplasma del parásito.

- ***Plasmodium*:** protozoario parásito que produce la enfermedad del paludismo.

- **Profesionales de laboratorio**: profesionales en laboratorio clínico, laboratoristas y técnicos capacitados en el diagnóstico microscópico de la malaria del minsal.

- **Receptibilidad:** presencia del mosquito transmisor de la enfermedad.

- **Trofozoíto maduro:** trofozoíto más grande y avanzado, generalmente ocupando todo el interior del eritrocito. Presenta una (mica masa de cromatina y granules de pigmento.

- **Trofozoíto:** es el estadío más joven del *plasmodium* (anillo) antes de que ocurra la división celular. Presenta cromatina y citoplasma.

- **Vulnerabilidad:** presencia de tránsito de personas de un área geográfica de influencia a otra.

Documento Derogado

# IX. Siglas y abreviaturas

| | |
|---|---|
| **BA** | Buscador activo |
| **CV** | Colaborador voluntario |
| **EPP** | Equipo de Protección Personal |
| **F** | Estadíos asexuales de *Plasmodium falciparum* |
| **Fg** | Gametocitos de *Plasmodium falciparum* |
| **Hd** | Hipoclorito disponible |
| **LNSP** | Laboratorio Nacional de Salud Pública |
| **ml** | Mililitro |
| **MINSAL** | Ministerio de Salud |
| **°C** | Grados centígrados |
| **p/p** | Peso sobre peso |
| **SMO** | Servicio médico oficial |
| **Spp** | Especie |
| **USCF** | Unidad de Salud Comunitaria Familiar |
| **V** | Estadíos de *Plasmodium vivax* |

Documento Derogado

# X. Bibliografía


División de Enfermedades Parasitarias CDC Atlanta. (s.f.). Comparación de las especies de *Plasmodium* spp. que parasitan a los seres humanos. Obtenido de www.cdc.gov

División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta. (s.f.). Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Image Library. Malaria. www.dpd.cdc.gov/dpdx.

División de Enfermedades Parasitarias, CDC, Atlanta, GA, Estados Unidos. (s.f.). *Plasmodium* spp. Estadíos sanguíneos, extendido fino. Obtenido de www.cdc.gov

Fox E and GT Strickland. The interrelationship of *Plasmodium* falciparum and P. vivax in the Punjab. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. (1989).

Organización Panamericana de Salud, Fundamentos del diagnóstico microscópico de la malaria. (2014).

Ministerio de Salud El Salvador, Guía clínica de la profilaxis post exposición. (2012).

Ministerio de Salud El Salvador. Manual de Procedimientos de Bioseguridad para los Laboratorios clínicos. San Salvador (2008).

Ministerio de Salud El Salvador. Manual de Procedimientos y Distribución de Reactivos. San Salvador. (2012).

Ministerio de Salud El Salvador. Memoria de labores. San Salvador. (2013-2018)

Ministerio de Salud de Costa Rica. Normas técnicas para el control de la Malaria. Costa Rica. (1997).

Ministerio de Salud El Salvador. Plan Nacional Malaria 2011-2015. San Salvador.

Organización Mundial de Salud. Bases del Diagnóstico Microscópico del Paludismo. 2a edición. Ginebra: OMS. (2014).

Organización Panamericana de Salud - Organización Mundial de Salud. (2017). Marco para la Eliminación de la Malaria.

Secretaría de Salud de Honduras. Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el Diagnóstico de Malaria. (2017).

World Health Organization. (2010). Basic Malaria Microscopy. Part I. Learner's Guide. Geneva: http://www.who.int.


Documento Derogado

## Anexo 1:

**Procedimientos de la Profilaxis Post Exposición Ocupacional**
(Guía clínica de la profilaxis post exposición, 2012)

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

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

Documento Derogado

**Anexo 2:**

## Preparación para una solución porcentual de hipoclorito

**Propósito:** Desinfectar adecuadamente las superficies de trabajo para disminuir los riesgos de contaminación con materiales biológicos peligrosos.

Para preparar una solución porcentual de hipoclorito, se debe tomar en cuenta, la concentración de Cloro activo indicado en el rótulo de hipoclorito o lejía, que se tiene disponible y utilizar las siguientes formulas:

Para calcular hipoclorito disponible (Hd)

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

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

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

Volumen de agua adicionado = 2000 ml-166 ml= 1834 ml.
1834 ml de agua + 166 ml de hipoclorito al 6% = 2000 ml de hipoclorito al 0.5%.
Nota:

a) El hipoclorito debe ser preparado diariamente.
b) El hipoclorito de sodio es un oxidante poderoso, motivo por el cual no debe ser utilizado para desinfectar objetos o superficies de metal, lo más recomendable es hacerlo con alcohol etílico al 70% (p/p).

Documento Derogado

**Anexo 3:**

## Preparación de colorante y soluciones

**Colorante de Giemsa**

Principio: Esta coloración se basa en destruir o deshemoglobinizar los glóbulos rojos, teñir los leucocitos, parásitos hemáticos y bacterias, es bastante utilizado para la identificación del *Plasmodium*, el cual tiñe de rojo su cromatina y azul el resto del parásito; los neutrófilos se tiñen de azul y violeta, los eosinófilos de rojo cobrizo, el citoplasma de los linfocitos de azul pálido y el citoplasma de los monocitos de azul intenso. En cuanto a las plaquetas el color puede variar de rosa a violeta y también varía en forma y tamaño.

**Identificación, Conservación y Almacenamiento del colorante**

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

**Reactivos y materiales**

•Alcohol Metílico (CH3OH), 99.9% de pureza PM: 32.04
•Glicerina anhidro colorante Azur Eosina, Azul de Metileno según GIemsa para microscopia.
•Glicerina Anhydro Colorante Azur Eosina, Azul de Metileno según Giemsa, para Microscopía Azure (51%) (C3H8O3), 99.9 % de pureza PM: 92.10
•Probeta de Vidrio 1000 ml
•Beaker de Vidrio de 250 ml.
•Embudo de Vidrio
•Garrafa de vidrio color ámbar
•Mascarilla
•Gafas de Protección
•Espátula de Acero Inoxidable.
•Papel para pesar
•Guantes descartables
•Gabacha

**Equipo**

•Balanza Granataria de un plato
•Hot plate

**Procedimiento**

1- Llevar a temperatura 55 ª C – 60 ª C el baño de maría
2- Poner la glicerina en frasco tapado con gasa y cubierto con papel aluminio durante 2 horas en baño de maría mezclar suavemente cada media hora
3-Pesar 7.6 de polvo de giemsa
4-Macerar los gramos de giemsa en un mortero con 500 ml. de glicerina calentada hasta que se triture bien el polvo de giemsa

Documento Derogado

5-Luego agregar 500 ml de alcohol metílico, ponerlo en un hot-plate hasta que esté bien disuelto el polvo.
6-Envasarlo en una garrafa color ámbar, rotularlo con nombre del reactivo, fecha de preparación y Nª de lote dejarlo madurar por una semana, agitándolo de 1-2 veces al día.
7- Para su uso se hace una dilución de acuerdo a su madurez y lote preparado
8-Tiempo de acuerdo a madurez del colorante y lote preparado.

**Solución amortiguadora**

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

**Para preparar la solución amortiguadora**

*Necesitará:*

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

*Procedimiento:*

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

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



Documento Derogado

10. Cuando las sales se hayan disuelto, eche la solución en el frasco cónico y rellene con agua hasta llegar a la marca de 1 litro.

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

**Para preparar los líquidos correctores al 2%**

*Necesitará:*

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

*El método:*

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

**Para comprobar y ajustar el pH de la solución amortiguadora**

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

Documento Derogado

**Anexo 4:**

MINISTERIO DE SALUD
GOBIERNO DE EL SALVADOR

## Cuidados y mantenimiento del microscopio

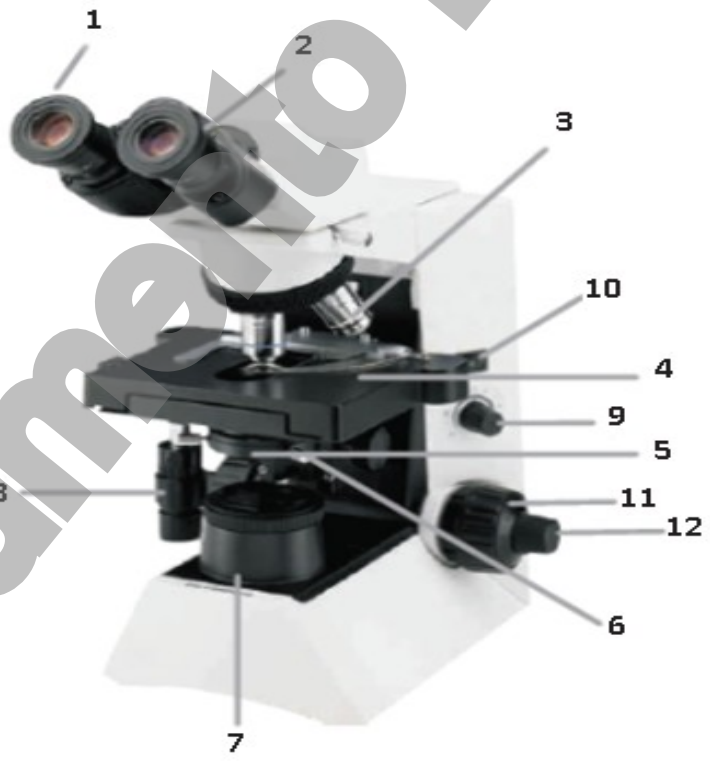
### Partes de un microscopio

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

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

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

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




### Uso del microscopio

Es importante aprender cómo se usa apropiadamente el microscopio, comprender sus limitaciones y conocer las medidas que se deben tomar para mantenerlo en buenas condiciones. Se necesita conocer el nombre de las partes del microscopio para poder seguir instrucciones durante las capacitaciones y visitas de supervisión, así como para describir aquellas partes que necesitan revisión o reemplazo.

Documento Dañado

Una combinación de lentes consistentes en un ocular 10X y un objetivo 100X, para un aumento total de 1000 veces, es la norma a la que se ajustan los microscopios compuestos clásicos. Todos los microscopios tienen incorporada una combinación de condensador y diafragma con los que se logra la intensidad luminosa óptima. Para una buena microscopía es necesario contar con una iluminación regulable. Cuando se enciende el microscopio se hace subir al máximo el condensador y se regula el diafragma en dos tercios de su apertura máxima. Luego se quita un ocular y se mira por el tubo. De ser necesario se alinea el condensador para que la luz brillante llegue al centro del condensador. Se vuelve a poner el ocular en su sitio. Se aleja el objetivo de la platina. Se aplica una gota de aceite de inmersión en el extremo de la gota gruesa y se coloca la lámina portaobjetos en la platina. Con el tornillo macrométrico se hace descender el objetivo hasta que toque el aceite. La muestra está lista entonces para ser examinada. Accionando el tornillo micrométrico se enfoca el campo y se regula la luz para tener una intensidad adecuada. Se seguirá el mismo procedimiento para observar el extendido fino. Al final de cada sesión se debe limpiar adecuadamente el objetivo de inmersión.

**Enfoque interpupilar**

El espacio entre los ojos es variable para cada persona. Por lo tanto, es necesario ajustar los oculares a la correspondiente distancia interpupilar para observar, con ambos ojos y a través de ambos oculares, un solo campo microscópico. Instrucciones: encienda el microscopio a una intensidad de iluminación confortable. Observe a través de ambos oculares. Observará un campo luminoso con el ojo izquierdo y otro con el ojo derecho. Para lograr la distancia interpupilar correcta, continúe observando el campo a través de un ocular mientras acerca o separa los oculares, ya sea utilizando la rosca entre ambos o tomando los oculares con ambas manos y presionando para juntarlos o separarlos. Cuando la imagen del ojo izquierdo y la imagen del ojo derecho se juntan en una sola imagen y se observa un solo campo luminoso con ambos ojos, se ha encontrado la distancia interpupilar correcta.

**Enfoque ocular**

Es necesario ajustar los oculares a cada ojo para poder observar una imagen nítida. Instrucciones: Enfoque la muestra con el micrométrico lo más claro posible, observando con ambos ojos. Coloque una tarjeta enfrente del ojo izquierdo y enfoque nuevamente lo más claro posible, haciendo girar suavemente la rosca macrométrica o micrométrica. Cuando se logra esto, coloque la tarjeta cubriendo el ojo derecho. Ya no toque el macrométrico ni el micrométrico. Para enfocar la imagen, gire la rosca del ocular izquierdo hasta que observe nítidamente el objeto enfocado. Ahora los oculares ya están ajustados a cada ojo, asegurando así una observación clara evitando esfuerzo innecesario y cansancio.

**Iluminación**

La mejor iluminación ofrece el mejor contraste. Instrucciones: encienda el microscopio y abra a su máxima apertura el diafragma de campo y el diafragma del condensador. Ajuste la luz a una intensidad confortable y enfoque la muestra. Observando por los oculares, disminuya la apertura del diafragma de campo hasta una pequeña luz. Si esta luz no está centrada en el campo microscópico, quiere decir que el condensador no está centrado. Utilizando ambos tornillos del condensador, gírelos despacio y alternativamente hasta colocar la luz en el centro del campo. A continuación, abra despacio el diafragma de campo hasta que la luz apenas desaparezca del campo visual. Ahora se debe ajustar el diafragma del condensador. Para ello, retire con cuidado el ocular izquierdo, vea a través del orificio y observe la imagen que se forma al cerrar despacio el diafragma del condensador. Debe obtener una imagen clara y con buen contraste, y la luz debe estar centrada en el campo microscópico. Coloque el ocular izquierdo en su lugar. Ya puede trabajar con el microscopio alineado y debidamente iluminado.

Documento Derogado

**Cuidados del microscopio**

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

- Se debe dejar el microscopio en un mismo lugar evitando su transporte constante o frecuente de un sitio a otro.
- Mientras no se utiliza, el microscopio se debe mantener cubierto con una funda de plástico o de tela para protegerlo del polvo, especialmente en zonas de clima cálido seco.
- Para proteger el microscopio de la proliferación de hongos especialmente en zonas de clima cálido húmedo. Se debe guardar en un cuarto con aire acondicionado o con deshumidificación permanente colocando en la caja del microscopio una bombilla de 15w que quede constantemente encendida, o conectando varias bombillas de 15 o 25w que queden constantemente encendidas en un armario cuyas puertas cierren bien.
- Límpiese el aceite del objetivo de inmersión todos los días.
- Indíquese el número de modelo y de ser posible el número de instrumento y de pieza cuando se pidan piezas de repuesto.
- No se debe desmontar el microscopio para limpiar partes de difícil acceso.
- No se debe utilizar alcohol para limpiar el microscopio.
- No se deben limpiar los oculares con otra cosa que no sea papel seco especial para lentes.
- No se deben dejar abiertos los portalentes. Si es necesario retirar los objetivos se debe utilizar la tapa provista o una cinta selladora para cerrar la abertura.
- No se deben intercambiar las lentes ni las piezas del microscopio.
- No se deben guardar los distintos oculares y objetivos sin antes haber colocado cada uno en un saco plástico herméticamente cerrado con una bolsita de gel de sílice autoindicador. Este gel es azul cuando está activo y cambia al rosado cuando ha absorbido toda el agua posible. El gel puede reactivarse por calentamiento y volverá a tomar el color azul.
- No se debe guardar el microscopio en su caja durante largos períodos ni transportarlo sin ajustar el tornillo que lo sujeta.

Documento Derogado

**Anexo 5:**

MINISTERIO DE SALUD
GOBIERNO DE EL SALVADOR

## Formulario de Reporte Epidemiológico de Malaria LAB-2

| | | |
|---|---|---|
| • C.V | Fecha de Examen: | Semana N°: |
| • S.M.O. | Departamento: | Láminas examinadas: |
| • B.A. | Municipio: | Casos: |
| Año: | Cantón: | *P. Vivax:* |
| Mes: | Caserío: | *P. Falciparum:* |

| Clave | Lámina N° | Fecha toma de muestra | Edad | Sexo | Código | Resultado |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

Nombre y firma de responsable: _____

Sello del establecimiento

Documento Derogado

## Instructivo de llenado de formulario LAB-2.

**Nombre del formato:** Reporte Epidemiológico LAB-2.

**Propósito:** Que los microscopistas y profesionales de laboratorio clínico del Diagnóstico laboratorial de la Malaria y los profesionales de Laboratorio del MINSAL, cuenten con un formato estandarizado (LAB-2) para el registro de los datos.

**Responsable del llenado:** Todos los profesionales en laboratorio clínico y técnicos que realizan el diagnóstico microscópico de la Malaria e inspectores del programa de la Malaria del MINSAL.

**Periodicidad:** Semanalmente.

**Descripción de llenado de formato**

A continuación, se describe la forma para el llenado del formato LAB-2.

Marcar con una X el cuadro que corresponde a la fuente de información:

**CV:** Colaborador voluntario (Col- Vol).

**SMO:** Servicio médico oficial.

**BA:** Búsqueda activa

**En las casillas**

**Año y mes:** Anotar el año y el mes que corresponde a la fecha que fue tomada la muestra

**Fecha de examen:** Anotar la fecha en que se realizó el diagnóstico microscópico

**Departamento:** Se anotará el nombre del departamento de donde proceden las muestras.

**Municipio:** Se anotará el nombre completo de este, de igual forma si proviene de

**Cantón o caserío.**

**N° semana:** Anotar el N° de la semana epidemiológica que corresponde a la fecha del diagnóstico microscópico de las muestras enviadas a control de calidad.

**Láminas examinadas:** Anotar el número total de láminas observadas en el laboratorio.

**Casos:** anotar los casos de Malaria encontrados en la semana epidemiológica de este reporte y agregar a continuación en la casilla *vivax* y *falciparum* el número de especies encontradas según corresponda.

**Clave del establecimiento:** Se anotará en esta casilla generalmente 2 caracteres: El primero corresponde al departamento (recordar que son 14 departamentos por lo que les corresponde del 1 al 14.

El segundo carácter identifica al informante, que puede ser un número o una letra. Si es un número corresponde a un colaborador voluntario, si es una letra corresponde a un establecimiento de salud (USCF u Hospital).

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

**Fecha toma de muestra:** Se anotará la fecha exacta de la toma muestra indicando día, mes y año.

**Edad:** Se anotará en número indicando años y meses.

**Sexo:** indicar en la casilla donde corresponde si es del sexo femenino con una **F** y masculino con una **M.**

**Código:** Es referente a la dirección donde vive actualmente el paciente, está generalmente compuesto por 4 caracteres: El primero indica el departamento, el segundo el municipio, tercero el cantón y cuarto el caserío. En los casos positivos se deberá anotar el nombre completo del paciente y la dirección exacta al reverso del formulario que permita ubicar con facilidad al paciente enfermo.

**Resultado:** En este espacio se anotará el resultado del examen de gota gruesa. Si el resultado es negativo a *Plasmodium* debe decir **No se observa *Plasmodium.*** En 100 campos Microscópicos observados. Y si es Positivo deberá reportarse el género y la especie del parásito con su respectiva densidad parasitaria.

**Nombre y firma del responsable:** anotar el nombre completo y la firma de la persona que realizó el diagnóstico.

**Sello y nombre de la institución:** En este espacio debe anotarse el nombre de la institución que reporta y su respectivo sello.

Documento Derogado

**Anexo 6:**

MINISTERIO DE SALUD
GOBIERNO DE EL SALVADOR

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

Establecimiento: _____

Mes y Año: _____
Muestras recibidas: _____
Muestras analizadas: _____

Observaciones:
_____
_____

Recomendaciones:
_____
_____

Concordancia o Disconcordancia Microscópica por parásitos
_____
_____

Concordancia o Disconcordancia en los procedimientos
_____
_____

Responsable de embalaje: _____

Responsable de microscopia: _____

Documento Derogado

**Anexo 7:**

MINISTERIO DE SALUD
GOBIERNO DE EL SALVADOR

Evaluación Directa Externa

**Prueba. Evaluación del desempeño Malaria**

NOMBRE DEL ESTABLECIMIENTO: _____

| | |
|---|---|
| Fecha de recepción de parel | |
| Fecha de Realización | |

Resultados

| Código de lámina | Resultados |
|---|---|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

Comentarios: _____

_____

_____

_____

_____

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

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

Fecha de envío resultados: _____

Sello del establecimiento

Documento Derogado

**Anexo 8:**

MINISTERIO DE SALUD
GOBIERNO DE EL SALVADOR

## Técnica toma de muestra sangre en papel filtro

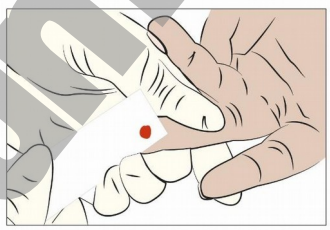
Muestra de sangre recolectada en papel filtro para diferentes pruebas.

**Materiales:**

1. Guantes descartables
2. Depósito para descartar material corto punzante
3. Papel filtro Nº 1 cuadrado de 17x17 mm realizado con lápiz grafito
4. Lancetas
5. Torundas de algodón
6. Alcohol etílico al 70%
7. Ficha de Registro de datos
8. Bolsas plásticas Koplic con cierre
9. Lápiz grafito.

**Procedimiento**

1. Identificar papel filtro anotando nombre, edad, dirección y fecha con lápiz grafito en el espacio de arriba.
2. Lavarse las manos con agua y jabón; posterior a secado colocarse guantes descartables.
3. Desinfectar el dedo anular con torunda de algodón impregnada con alcohol al 70 %.
4. Dejar secar a temperatura ambiente.
5. Hacer masaje en dedo, realizar punción con la lanceta estéril, descartar la primera gota de sangre, limpiándola con una torunda de algodón sin alcohol y colectar la muestra en el papel filtro en el cuadro marcado con lápiz grafito.
6. El papel filtro debe quedar impregnado de sangre sin dejar espacios en blanco.



**Secado de la muestra**

1. Poner el papel filtro con muestra de sangre a secar a temperatura ambiente cuidando que estén libres del polvo, insectos y no les de luz directa.

Documento Derogado

2. Cuando la muestra de sangre esté completamente seca, guardar en bolsas plásticas Koplic.

**Conservación de la muestra**

1. Las muestras deben ser llevadas lo más rápido posible al laboratorio donde serán guardadas o procesadas.
2. Guardar en refrigeración. No congelar

**Papel filtro recién tomado**

De esta forma debe quedar impregnado y con sus datos completos el papel filtro:

- El cuadrado donde se pone la sangre aproximadamente de 17 x 17 mm en cada lado aproximadamente.
- Escribir datos con lápiz grafito, no cerca de la muestra

**Papel filtro completamente seco**

Papel filtro completamente seco y debidamente identificado.

**Empacamiento y transporte**

1. Papel filtro debidamente empacado en bolsa plástica.
2. En la parte superior de bolsa poner datos de paciente y fecha de toma de muestra.
3. Guardar en refrigeración (NO CONGELAR)
4. Enviar al laboratorio donde se concentrarán o se analizarán las muestras.

Documento Derogado