

1. Objetivo

El presente documento establece los lineamientos que se deben seguir para realizar el diagnóstico microscópico de malaria por gota gruesa y frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa.

2. Alcance

Aplica a todos los laboratorios públicos y privados de la red nacional de malaria de Costa Rica.

3. Definiciones y abreviaturas

Definiciones

Buffer: Solución amortiguadora compuesta de sales.

Citoplasma: Protoplasma del parásito

Cromatina: Material nuclear del parásito, toma una coloración roja al teñirse con Giemsa.

Deshemogloblinización: proceso que tiene como objetivo eliminar la hemoglobina presente en los glóbulos rojos de la gota gruesa con el fin de obtener un fondo claro que permita visualizar mejor los parásitos.

Eosinófilos: Tipo de célula de la serie de los leucocitos.

Frotis sanguíneo: Se conoce también como extendido fino. Consiste en una capa delgada única de células sanguíneas distribuidas de forma homogénea en la superficie de una lámina portaobjetos.

Gametocito: Formas sexuales del parásito que se desarrollan y maduran en el glóbulo rojo.

Gota gruesa: Gota de sangre depositada en un portaobjetos y distribuida en forma homogénea en un área definida, donde el conjunto completo de los elementos de la sangre se distribuye de manera uniforme. La concentración de glóbulos rojos facilita la detección de los parásitos que pudieran estar presentes aumentando la posibilidad de detección cuando la densidad parasitaria es baja.

Leucocitos: Glóbulos blancos o células que están principalmente en la sangre.

Monocitos: Tipo de célula de la serie de los leucocitos.

Neutrófilos: Tipo de célula de la serie de los leucocitos.

Parásito: Organismo que vive a expensas de otro, causándole daño.

Plaquetas: Células producidas por los megacariocitos en la médula ósea mediante el proceso de fragmentación citoplasmática.

Colorante de Giemsa: Colorante derivado de Romanowsky que se utiliza para la tinción de parásitos en gotas gruesas sanguíneas. Colorante de elección para diagnóstico microscópico de malaria.

Trofozoíto: Parásitos asexuales. Los trofozoítos más jóvenes de cada especie generalmente se denominan “anillos” o “formas anulares”.

Abreviaturas

C.C.S.S: Caja Costarricense de Seguro Social

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

CNRP: Centro Nacional de Referencia en Parasitología

DTIR: Detección-Diagnóstico, Tratamiento, Investigación y Respuesta

Inciensa: Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PEEDM: Programa de Evaluación Externa del Desempeño en el Diagnóstico Microscópico de Malaria.

PDR: pruebas de diagnóstico rápido

RT: Responsable Técnico

IREM: Iniciativa Regional de Eliminación de la malaria

4. Responsabilidades

El Responsable Técnico del Laboratorio de Malaria del Centro Nacional de Referencia en Parasitología del Inciensa es responsable de mantener actualizado este procedimiento y procura que se encuentre accesible para cada uno de los laboratorios de la red nacional de malaria.

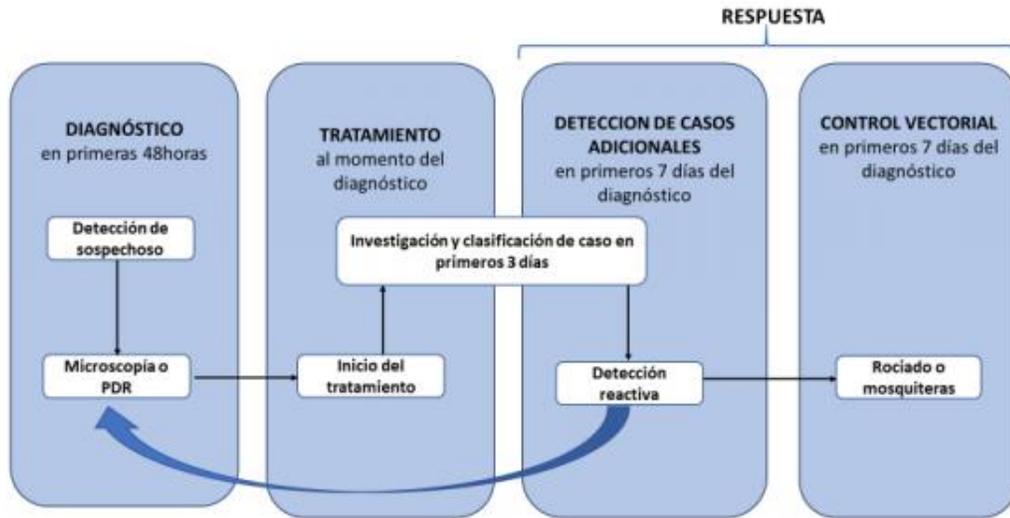
La Jefatura de cada laboratorio de la red diagnóstica de malaria garantiza que este documento sea compartido con todo el personal a su cargo involucrado con el diagnóstico de malaria.

Los microbiólogos que realizan diagnóstico de malaria en cada laboratorio son responsables de seguir los lineamientos establecidos en este documento y de socializarlos con el personal técnico que apoya las actividades aquí mencionadas. Además, deben supervisar al personal a su cargo para garantizar que se siguen los procedimientos descritos en este documento.

5. Desarrollo

5.1 Introducción

El diagnóstico oportuno y el inicio inmediato del tratamiento son los pasos iniciales en la estrategia DTIR (Detección-Diagnóstico, Tratamiento, Investigación y Respuesta) establecida por OMS/OPS para acelerar el proceso hacia la eliminación de la malaria. Esta estrategia lo que busca es captar los casos sospechosos para confirmar el diagnóstico, notificar prontamente el hallazgo de esos casos positivos, darles tratamiento inmediato para detener la transmisión, investigarlos en los primeros 3 días posteriores al diagnóstico y que se dé una respuesta en el foco donde ocurrió la transmisión (de detección oportuna y tratamiento de otros casos si los hubiera) en un período de 7 días, todo esto con el fin de cortar la transmisión del parásito.


Figura 1. Estrategia DTIR

Fuente: OMS. Manual de estratificación según el riesgo de malaria y eliminación de focos de transmisión.

La microscopía es el estándar de oro para el diagnóstico de malaria y se realiza mediante el análisis de la gota gruesa y el frotis sanguíneo, que permite detectar la presencia del parásito y con esto diferenciar láminas positivas/negativas, clasificar la especie parasitaria, así como realizar el conteo parasitario. En Costa Rica se utiliza la microscopía en todos los estratos de riesgo malárico. La utilización de PDR, es una herramienta diagnóstica de gran utilidad en escenarios donde la microscopía no pueda realizarse con oportunidad, en zonas geográficas de difícil acceso y con alto movimiento migratorio. En nuestro país se utilizan en estratos 3 y 4 de riesgo donde no se pueda brindar un diagnóstico microscópico inmediato.

El país se encuentra en una etapa crucial de eliminación de la malaria donde se debe garantizar que el diagnóstico sea certero y por ello existe un sistema de aseguramiento de la calidad, a cargo del Centro Nacional de Referencia de Parasitología que tiene como objetivo garantizar una mayor confiabilidad en los resultados de laboratorio.

5.2 Descripción general de la enfermedad

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria causada por parásitos del género *Plasmodium* sp. transmitida al hombre fundamentalmente por medio de la picadura de un mosquito hembra del género *Anopheles*.

En la región de las Américas las infecciones son causadas principalmente por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, que cursan con un cuadro de escalofríos fuertes, fiebre y sudoración, que puede acompañarse de otros síntomas como dolor de cabeza, articulares o musculares, náusea, diarrea, debilidad y otros. En casos severos causados por *P. falciparum* puede presentarse ictericia, defectos en la coagulación, insuficiencia renal, edema cerebral, pulmonar coma y muerte. La reproducción asexual de los parásitos en la fase sanguínea de la enfermedad es responsable de las manifestaciones clínicas, pues se producen ciclos de hemólisis repetidas.

5.3 Agente infeccioso

Se han identificado cinco especies de plasmodios que pueden afectar al hombre:

- *Plasmodium vivax*,
- *Plasmodium falciparum*,
- *Plasmodium malariae*,
- *Plasmodium ovale*
- *Plasmodium knowlesi*

La especie más común es *P. falciparum* que predomina en el África subsahariana; *P. ovale* se encuentra en África y esporádicamente en Asia. *P. knowlesi* se ha diagnosticado en el sureste de Asia y sus reservorios naturales son varias especies de macacos.

En las Américas predomina *P. vivax*, también circula *P. falciparum*, y muy esporádicamente *P. malariae*.

5.4 Mecanismo de transmisión

La enfermedad se transmite principalmente por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* infectado, sin embargo, también se puede dar transmisión transfusional o durante el embarazo.

5.5 Período de incubación

Es el tiempo transcurrido desde la picadura hasta la aparición de los síntomas, el cual va de una a dos semanas aproximadamente. En el caso de *P. malariae* podrían aparecer los síntomas hasta 30 días después de la picadura.

5.6 Ciclo biológico

El ciclo biológico de la malaria involucra a dos huéspedes (humano y mosquito). El anofelino hembra infectado al picar a una persona sana inculca los parásitos (esporozoítos) directamente a un capilar pasando estos a la circulación del huésped. Estos parásitos penetran posteriormente al interior de las células del parénquima hepático donde se diferencian en dos formas distintas, unas las que comienzan a desarrollar esquizontes hepáticos o preeritrocíticos y en el caso de *P.*

vivax y *P. ovale*, también aparecen los hipnozoítos. Los esquizontes al madurar y romperse, liberan y diseminan las formas infectantes para los glóbulos rojos: merozoítos.

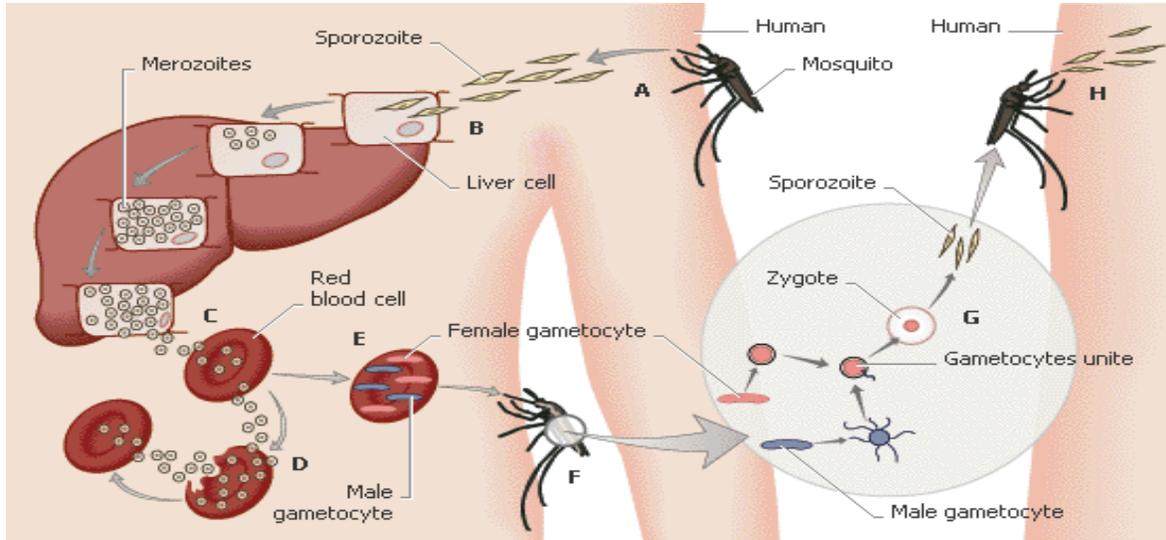


Figura 2. Ciclo de vida de *Plasmodium* sp

Los hipnozoítos pueden permanecer latentes provocando futuras recaídas de la enfermedad en infecciones producidas por *P. vivax* y *P. ovale*, únicas especies en las que estas formas aparecen. Luego de un tiempo (meses o años), los hipnozoítos salen de su estado de latencia y comienzan a producir la esquizogonia exoeritrocítica, formando generaciones de merozoítos que invaden la sangre y producen recaída clínica.

El ciclo eritrocítico (esquizogonia sanguínea) es la invasión, crecimiento y multiplicación asexual del parásito en los glóbulos rojos, este parásito dentro del glóbulo rojo se llama trofozoíto. Al sufrir división de su núcleo, los parásitos pasan a ser esquizontes jóvenes y maduros hasta romper el glóbulo rojo, liberando nuevos merozoítos que irán a otros glóbulos rojos. Este proceso incrementa la parasitemia a menos que sea detenido por la respuesta inmune del huésped o por el tratamiento específico.

Algunos merozoítos que han ocupado los glóbulos rojos en vez de convertirse en esquizontes, desarrollan a gametocitos (microgametocito y macrogametocito).

Cuando un mosquito se alimenta de sangre de una persona enferma, ingiere los gametocitos iniciándose el ciclo de reproducción sexual o ciclo esporogónico, el gametocito masculino (microgameto), al madurar, exflagela y fecunda al gametocito femenino (macrogameto), formando el cigoto u ooquinetos. Este se moviliza atravesando la pared estomacal del mosquito, se enquistan en su exterior (ooquiste) el cual madura y libera los esporozoítos que se diseminan en la cavidad abdominal del mosquito para luego concentrarse en las glándulas salivales y quedan listos para infectar a un nuevo huésped humano, reiniciando así el ciclo asexual.

Es importante recalcar que, si el tratamiento de cura radical no ha sido efectivo, en el caso de infecciones por *P. vivax* y *P. ovale*, se repite nuevamente el ciclo exoeritrocítico varios meses o años después, según la cepa de que se trate. Los hipnozoítos son los responsables de las

verdaderas recaídas tardías, hasta tres años después de la primera infección. En tanto que en infecciones por *P. falciparum* y *P. malariae* la esquizogonía hepática solo se forma una vez, pues en estas especies no existen los hipozoítos.

5.7 Normas de bioseguridad en el laboratorio

El personal que manipula muestras de sangre debe seguir los lineamientos de bioseguridad de cada laboratorio, ya que toda muestra de sangre **debe ser considerada como potencialmente infecciosa**. Por lo tanto, para reducir el riesgo de contaminación se dan las siguientes recomendaciones:

1. El acceso al laboratorio debe ser otorgado solo a personal autorizado.
2. Todo material utilizado para la toma de la muestra debe ser estéril.
3. El personal que manipule muestras de sangre debe estar capacitado y usar en todo momento el equipo de protección personal que corresponda (gabacha manga larga correctamente cerrada, guantes descartables, lentes, entre otros.)
4. No se debe tocar ojos, nariz o piel expuesta con las manos enguantadas.
5. Si existe sospecha de que los guantes se han contaminado, éstos deben descartarse, lavarse bien las manos con agua y jabón y utilizar un nuevo par de guantes.
6. Cualquier derrame o accidente que ocurra dentro del laboratorio, debe comunicarse de inmediato al encargado o coordinador del área.
7. No se debe comer, fumar, aplicar maquillaje o utilizar teléfonos celulares dentro de los laboratorios.
8. Al finalizar la jornada de trabajo, se recomienda desinfectar superficies utilizando una solución de cloro al 0.5 % o de alcohol al 70 %.
9. Todo material contaminado con sangre debe ser descartado en recipiente para material bioinfeccioso o punzocortante según corresponda.
10. Al salir del laboratorio, se debe remover todo el equipo de protección personal y realizar un adecuado lavado de manos.

5.8 Preparación de la gota gruesa y frotis sanguíneo (extendido fino)

5.8.1 Láminas portaobjetos para gota gruesa

La buena calidad de las láminas portaobjetos que se utilizan para elaboración de gota gruesa y frotis es fundamental para obtener un diagnóstico adecuado. En la medida de lo posible, se debe utilizar láminas nuevas o en su defecto, láminas sin rayaduras.

Además, **los portaobjetos deben estar libres de grasa** pues puede interferir con la adhesión de la sangre a la superficie de la lámina, por lo cual se recomienda realizar el proceso de lavado que se describe a continuación incluso si se utilizan láminas nuevas:

- Deje las láminas portaobjetos de un día para otro en una solución diluida de jabón neutro (aproximadamente 5 %)
- Al día siguiente frótelas con una esponja que no deje rayas y enjuague bien con agua del tubo para eliminar todo resto de jabón
- Deje secar

Las láminas lavadas se pueden mantener empacadas en papel kraft hasta el momento de su uso para evitar que se llenen de polvo y si es posible, se pueden guardar con desecante. Otra alternativa es mantenerlas sumergidas en un recipiente con alcohol y al momento de usar, secarlas bien con gasa o toalla.

5.8.2 Elaboración de la gota gruesa y frotis sanguíneo a partir de sangre capilar

Materiales

- Lámina extensora de bordes pulidos
- Lancetas estériles descartables
- Algodón
- Láminas portaobjetos previamente lavadas (libres de grasa)
- Equipo de protección personal: guantes y gabacha
- Lápiz de grafito o marcador de tinta que no se borra
- Un basurero de descarte de punzocortantes y otro para infecciosos
- Plantilla para la elaboración de la gota gruesa y el frotis sanguíneo (Anexo 1)

Procedimiento:

- Colóquese el equipo de protección personal (gabacha y guantes).
- Registre los datos del paciente e identifique el portaobjetos donde se va a ubicar la muestra de sangre. Coloque la lámina sobre la plantilla.
- Sostenga la mano izquierda del paciente. Seleccione el tercer dedo a partir del pulgar o el dedo anular (el dedo gordo del pie puede ser utilizado en niños menores de un año).
- Limpie el dedo con una pieza o torunda de algodón ligeramente humedecida con alcohol.
- Seque el dedo con un algodón limpio y seco, utilizando golpes firmes para estimular la circulación de la sangre.
- Sostenga el dedo del paciente tomándolo por sus lados, manteniendo una suave presión sobre ellos para favorecer la salida de sangre.

- Puncce el borde de la yema del dedo con una lanceta estéril y movimiento rápido, presione suavemente para extraer la primera gota de sangre y limpie con una torunda de algodón seco (esta primera gota de sangre debe ser eliminada). Asegúrese que ninguna hilacha de algodón pueda mezclarse posteriormente con la sangre.
- Aplique suave presión al dedo para extraer otra gota de sangre muy pequeña y colóquela inmediatamente sobre el portaobjetos, en la base del frotis de la plantilla. Si no cuenta con la plantilla colóquela aproximadamente en el centro de la lámina.
- Presione nuevamente el dedo y colecte otra gota de sangre del tamaño de una cabeza de alfiler. Colóquela en la zona de la plantilla destinada para la gota gruesa. Si no cuenta con plantilla, ubíquela a 1 cm de la primera. La cantidad de sangre no debe ser excesiva.
- Para elaborar la gota gruesa, con la esquina de la lámina extensora distribuya la sangre en no más de seis movimientos, formando un círculo de aproximadamente 1 cm de diámetro Iniciando del centro y con movimientos circulares concéntricos hacia afuera, luego devuélvase en un solo movimiento en dirección contraria hasta llegar de nuevo al centro.
- Mueva la lámina realizando movimientos circulares con el fin de que la sangre quede homogéneamente distribuida.
- Para el frotis, deje fluir la sangre por capilaridad sobre un extremo del portaobjeto extensor teniendo el cuidado de dejar aproximadamente $\frac{1}{2}$ cm a ambos lados de la lámina extensora, formando un ángulo de 45° se esparce la sangre moviendo la lámina extensora hacia adelante (hacia el borde sin esmeril). Tenga cuidado de que la cola del frotis quede sobre el portaobjetos.
- Asegúrese que la lámina quede correctamente identificada en la zona esmerilada, utilice lápiz de grafito. Si no se cuenta con láminas esmeriladas puede utilizar lápiz de cera o bien, se puede identificar la muestra con lápiz de grafito en la parte gruesa del extendido. Nunca rotule la gota gruesa.
- Limpie la sangre restante del dedo con una torunda de algodón humedecido con alcohol e indique al paciente que presione la torunda contra el lugar de la punción por unos cinco minutos aproximadamente.
- Deje secar la lámina en posición horizontal, cuidando que no le caiga polvo.

5.8.3 Elaboración de la gota gruesa y frotis sanguíneo a partir de sangre total (EDTA)

La gota gruesa y el frotis también pueden ser elaborados a partir de sangre total recolectada en tubo con EDTA (tapón lila). En caso de utilizar esta alternativa se recomienda elaborar la gota gruesa inmediatamente después de la toma de muestra, porque después de unas cuantas horas

de tomada la muestra, la morfología tanto del parásito como de los glóbulos rojos puede verse afectada.

Materiales

- Puntas para micropipeta
- Micropipeta
- Láminas portaobjetos previamente lavadas (libres de grasa)
- Lámina extensora de bordes pulidos
- Lápiz de grafito o marcador de tinta que no se borra
- Un basurero de descarte de punzocortantes y otro para infecciosos
- Equipo de protección personal: guantes y gabacha
- Plantilla para elaboración de la gota gruesa y frotis sanguíneo (Anexo 1)

Procedimiento

Para la toma y elaboración de la muestra, siga el siguiente procedimiento:

- Colóquese el equipo de protección personal.
- De previo, identifique la lámina portaobjetos donde se va a ubicar la muestra de sangre.
- Coloque la lámina sobre la plantilla.

Frotis sanguíneo:

- Ajuste la micropipeta para un volumen de 2 μ l a 5 μ l.
- Homogenice la sangre en el tubo, extraiga la sangre y colóquela en la base del espacio destinado para el frotis, según está demarcado en la plantilla.
- Coloque la lámina extensora en un ángulo de 45° y deslícela sobre el portaobjetos hacia el extremo sin esmeril para realizar el extendido fino. Tenga cuidado de que la cola del frotis quede sobre el portaobjetos.

Gota gruesa:

- Ajuste la micropipeta a un volumen de 6 μ l a 8 μ l.
- Homogenice el tubo con sangre y extraiga la cantidad mencionada.
- Con una esquina de la lámina extensora distribuya la sangre formando círculos concéntricos, iniciando del centro y con movimientos circulares concéntricos hacia afuera, luego devuélvase en un solo movimiento en dirección contraria hasta llegar de nuevo al centro. Se recomienda realizar el mínimo de movimientos posible para no romper las células.
- Mueva la lámina realizando movimientos circulares con el fin de que la sangre quede homogéneamente distribuida.
- Deje secar la lámina en posición horizontal, cuidando que no le caiga polvo. Las muestras realizadas a partir de sangre con EDTA pueden requerir un poco más de tiempo en el secado.

5.8.4 Secado de la muestra

La gota gruesa se puede secar a temperatura ambiente, sin embargo, al ser el diagnóstico de malaria un diagnóstico **de urgencia, que requiere tratamiento oportuno**, es necesario acelerar el secado. Durante el secado se debe colocar la lámina en una superficie horizontal.

Cuando la gota gruesa ya no se observe húmeda utilice alguna de estas opciones para un pronto secado:

- Se puede utilizar el aire de una secadora de cabello a baja temperatura a una distancia de unos 30 cm, por unos pocos segundos
- Coloque la muestra en una incubadora a 37 °C por aproximadamente una hora. Evite colocarla directamente sobre superficies calientes.

-Evite exponer la muestra a calor excesivo (temperaturas superiores a 60 °C), ya que esto provoca la fijación de los glóbulos rojos

- Durante el secado y manipulación de las muestras, se debe proteger las láminas de insectos y del polvo.

5.8.5 Errores comunes en la elaboración de la gota gruesa

Mucha sangre

Si se utiliza demasiada sangre al confeccionar la gota gruesa se observarán muchos leucocitos por campo microscópico lo que puede enmascarar la presencia de los parásitos. También se afecta la correcta deshemoglobinización de los glóbulos rojos y, por lo tanto, la adecuada lectura de la lámina. Esto se controla utilizando los volúmenes recomendados de sangre para la gota gruesa.

Poca sangre

Si se emplea poca sangre en la preparación de las muestras, no habrá suficientes células blancas por campo y no se examinará suficiente cantidad de sangre en la gota gruesa, disminuyendo así la sensibilidad de la prueba, lo cual puede provocar falsos negativos en presencia de bajas parasitemias. Esto se controla utilizando los volúmenes recomendados de sangre para la gota gruesa.

Lámina con grasa

En una lámina con grasa (suele pasar con las láminas nuevas), la sangre se esparcirá irregularmente dificultando el examen microscópico. Por otro lado, la totalidad o parte de la gota gruesa podría desprenderse durante el proceso de coloración ya que la grasa impide la adhesión

de las células a la lámina. Para evitar este problema se recomienda realizar un lavado previo de las láminas portaobjetos según se describió previamente.

Borde irregular de la lámina extensora

Cuando el borde de la lámina empleada como extensora está astillado, el frotis se esparce irregularmente afectando la distribución homogénea de los glóbulos rojos.

Otros errores comunes

- Dejar las láminas expuestas a moscas, cucarachas, hormigas y otros insectos que se alimenten de sangre seca y dañen las muestras de sangre.
- Realizar gotas gruesas y frotis en láminas rayadas o sucias.
- Secado incompleto de la gota gruesa lo cual provoca que se desprenda durante la coloración.
- Autofijación de la gota gruesa que ocurre con la exposición al calor o al dejar la lámina más de ocho días sin teñir. En estos casos, la deshemoglobinización de la muestra es inadecuada y se observan los estromas de los eritrocitos dificultando el análisis de la gota gruesa.

5.9 Tinción de la gota gruesa y frotis con colorante de Giemsa

La ventaja de este método consiste en que el diluyente del colorante es un buffer en medio acuoso, por lo que la deshemoglobinización se lleva a cabo simultáneamente durante la tinción. Antes de realizar la tinción asegúrese que la gota gruesa ha secado adecuadamente, pues de lo contrario podría desprenderse.

Materiales

- Colorante de Giemsa
- Buffer de fosfatos pH 7.2
- Cronómetro
- Metanol
- Bandeja para tinción o placa de Petri
- Guantes y gabacha
- Recipiente limpio para preparar la solución de coloración
- Recipiente de boca ancha para lavado de láminas

Nota: El reactivo de Giemsa y buffer de fosfatos es provisto a los laboratorios de la C.C.S.S por el Laboratorio de Reactivos de la C.C.S.S.

5.9.1 Fijación del frotis sanguíneo

- Antes de iniciar colóquese el equipo de protección personal.
- Sumerja el frotis en un recipiente de boca ancha con metanol, de manera que quede completamente impregnado.
- Se debe dejar la distancia adecuada para que el metanol no suba y fije la gota gruesa.
- Retire el excedente de metanol y deje secar la lámina en posición horizontal a temperatura ambiente por alrededor de dos minutos. Si se colocara de manera vertical los vapores del metanol podrían ascender y fijar la gota gruesa.

5.9.2 Preparación de la disolución de coloración

- Prepare el buffer según las indicaciones provistas por el fabricante. Hay buffer que se distribuyen listos para usar mientras, que en otros casos se distribuye concentrado y se debe diluir previo a su uso para preparar la disolución de coloración.
- Por ejemplo, si el buffer se distribuye en concentración 10X, debe realizarse una dilución en agua destilada para llevarlo a 1X. Para preparar 10 ml de buffer 1X tome 1 ml de buffer 10X y agregue 9 ml de agua destilada.
- Revise la información de la estandarización del tiempo de coloración para el lote de colorante en uso (Ver 5.9.4)
 - En un recipiente limpio prepare una dilución al 10 % del colorante de Giemsa (9 partes de buffer de fosfatos 1X y 1 parte de colorante de Giemsa).

Cantidad de disolución de coloración a preparar (ml)	Buffer 1X (ml)	Colorante de Giemsa (ml)
10	9	1
20	18	2
30	27	3
40	36	4
50	45	5

- Tome el colorante de la superficie de la botella, ya que si lo hace del fondo arrastrará sedimento. El colorante de Giemsa es una solución sobresaturada que normalmente puede generar precipitados.
- Cada lámina puede requerir unos 5 ml de disolución de coloración aproximadamente, y esta se prepara **inmediatamente antes de teñir**, si se hace con tiempo previo el colorante se puede oxidar y la tinción no será adecuada.

-Una vez lista la disolución, mezcle cuidadosamente por inversión, evitando la formación de burbujas que pueden interferir a la hora de la tinción.

Importante: Se recomienda filtrar el colorante a utilizar o bien la disolución de coloración antes de teñir las láminas con el fin de evitar el precipitado.

5.9.3 Tinción de la lámina

-Luego de la fijación del frotis con metanol, coloque la lámina en la bandeja para tinción o placa Petri, ya sea hacia abajo (con la lámina inclinada) o hacia arriba. Se prefiere la tinción hacia abajo debido a la posibilidad de aparición de precipitado de colorante o de artefactos producidos por detritos de glóbulos rojos que se producen durante la deshemoglobinización.

-En caso de que se utilice la tinción hacia abajo, se recomienda poner un relieve para crear un desnivel y que la gota gruesa esté del lado opuesto (en la parte más baja), de manera que tenga contacto con el colorante.

-Agregue el colorante asegurándose que cubra toda la lámina, que no se haya retraído en alguna zona y que no queden burbujas. Es importante verificar que, durante todo el tiempo de coloración, la muestra tenga contacto con la disolución de coloración.

-Deje que las láminas se tiñan el tiempo determinado por el laboratorio durante la estandarización de cada lote. (Ver punto 5.9.4). Por lo general el tiempo de coloración puede rondar aproximadamente de 8 min a 10 min, sin embargo, estos tiempos pueden variar según el lote de colorante y deben corroborarse previamente y ajustarse si fuese requerido.

-Al finalizar el tiempo de tinción, levante la lámina despacio, de forma cuidadosa, de lo contrario se puede desprender la gota gruesa.

-Para retirar el exceso de colorante, lave con cuidado mediante su inmersión en un recipiente de boca ancha con agua o buffer de fosfatos. Durante el lavado se debe evitar que la capa metálica que se formó durante la tinción se adhiera a la lámina, ya que dificulta la lectura microscópica. No ponga la lámina directamente debajo del chorro de agua pues la muestra podría desprenderse.

-A continuación, retire el excedente de agua o buffer y limpie la parte de atrás de la lámina, para asegurarse que no queden manchas de colorante que interfieran con la lectura.

-Deje secar a temperatura ambiente o se puede acelerar el secado según 5.8.4.

-Examine las láminas al microscopio con objetivo de inmersión (100X) para evaluar la calidad de la tinción. Verifique la correcta deshemoglobinización y coloración de las estructuras celulares.

5.9.4 Estandarización de un lote nuevo de reactivo de Giemsa

Cada vez que se recibe un lote nuevo de reactivo de Giemsa, debe realizarse un proceso para determinar el tiempo que produce los mejores resultados de coloración.

A partir de láminas de gota gruesa y frotis negativos, prepare una dilución al 10 % del colorante en buffer de fosfatos y tiña de 8 min a 10 min. Verifique al microscopio los resultados de coloración. Se sugiere utilizar un registro similar al Anexo 7. Estandarización de lotes de colorante de Giemsa.

Lea la lámina al microscopio y verifique:

- Las plaquetas se ven en el fondo como agrupaciones de gránulos finos rojizos
- Los núcleos de los leucocitos se tiñen intensamente de coloración azul-violeta
- Se observan teñidos los citoplasmas de los leucocitos y pueden observarse gránulos según el tipo de leucocito
- En el fondo no se observan los estromas de los eritrocitos, puede verse un fondo color azul claro, pero permite observar las plaquetas con claridad.

Si este tiempo no produce resultados óptimos, se pueden aumentar o disminuir según sea necesario hasta obtener una tinción adecuada. El tiempo que obtenga los mejores resultados de coloración será el que debe utilizarse para el trabajo cotidiano con ese lote de reactivo.

Importante: el tiempo de coloración determinado durante este proceso debe estar accesible para que el personal de laboratorio que utilice ese lote de reactivo, trabaje de forma estandarizada y obtenga resultados óptimos de tinción. Es recomendable colocar este dato junto al kit de colorante.

Recuerde:

- El tiempo de tinción debe verificarse cada vez que se recibe un nuevo lote de reactivos.
- El material utilizado para preparar y teñir las láminas (beakers, bandejas de tinción, entre otros.) debe lavarse muy bien después de su uso para eliminar restos de colorante. Siempre debe utilizarse recipientes limpios para preparar las soluciones, esto asegurará obtener resultados satisfactorios en la tinción.
- Almacene el colorante bien tapado y protegido de luz directa (frasco ámbar).
- Cuide que la solución stock de Giemsa no se mezcle con agua.
- No agite la botella de colorante antes de utilizarla, al ser una solución sobresaturada los cristales en el fondo se mueven y puede provocar precipitado
- No devuelva el colorante no utilizado a la botella stock.
- Prepare la solución de coloración inmediatamente antes de usar.
- Prepare el buffer según las indicaciones del fabricante. Algunos buffers vienen listos para usar mientras que otros requieren un paso de dilución previa en agua destilada.

5.10 Uso y cuidados del microscopio

Teniendo los cuidados necesarios con el microscopio se puede asegurar su buen funcionamiento por muchos años.

- Cuando el microscopio no se encuentre en uso se debe mantener tapado con su cobertor para proteger los lentes de la acumulación de polvo.
- La grasa de las pestañas, de la piel de la cara y de los dedos puede depositarse fácilmente en los lentes. Estas partes deben limpiarse con papel para lentes después de cada uso.
- Los objetivos de inmersión deben quedar bien limpios después del uso, pues el aceite acumulado se endurece con el tiempo y el objetivo acabará por volverse inservible. Utilice un trozo de papel para lentes exclusivo para el lente de inmersión. Para limpiar otras partes del microscopio utilice otro trozo de papel limpio para evitar arrastrar aceite del lente de inmersión a los otros lentes.
- Si necesita trasladar el microscopio de una mesa a otra dentro del laboratorio, no lo levante sosteniéndolo de la platina, tome con una mano el brazo del microscopio y con la otra la base.
- Cuando se debe trasladar el microscopio de un laboratorio a otro hay que asegurarse que esté bien fijado dentro de su caja.
- Todo microscopio debe contar con un plan de mantenimiento preventivo para asegurar su adecuado desempeño y buen funcionamiento durante toda la vida útil del equipo.
- Reporte cualquier fallo detectado en el uso cotidiano con el fin de que se realice el mantenimiento correctivo de manera oportuna.
- Se recomienda utilizar un registro de uso como el que se sugiere en el Anexo 8

5.11 Lectura de la gota gruesa y frotis sanguíneo

El tratamiento adecuado del paciente con malaria depende de un diagnóstico cuidadoso, lo cual implica establecer correctamente la especie parasitaria y cuantificar el número de parásitos presentes en la muestra.

El diagnóstico microscópico de la malaria se basa en la observación inicial de la gota gruesa pues es la muestra más sensible ya que está formada por varias capas de glóbulos rojos distribuidos en un área más pequeña que el frotis. Tiene una sensibilidad 20 a 30 veces mayor que el frotis o extendido fino.

En los casos positivos, se hace necesario identificar la especie parasitaria por lo que se continúa con la exploración del frotis sanguíneo. En el frotis los glóbulos rojos están intactos (no hay deshemoglobinización pues se fija con metanol) y es posible observar con mayor detalle ciertas características morfológicas tanto del glóbulo rojo como de los parásitos que ayudan a la identificación de la especie infectante. Por ejemplo, los glóbulos rojos parasitados con *Plasmodium vivax* se observarán agrandados, deformados y con punteado de Schüffner.

A como sucede con los leucocitos, los parásitos en la gota gruesa también parecen más pequeños que en el frotis. Como la gota gruesa está formada por varias capas de sangre, se

debe enfocar ajustando el micrométrico hacia arriba y hacia abajo con cada cambio de campo de lectura, para poder observar los diferentes niveles de profundidad en la muestra.

5.11.1 Control de calidad de la gota gruesa y frotis

La lectura de la gota gruesa y frotis se realiza en el microscopio con objetivo de inmersión (100X). Antes de realizar la lectura microscópica de la lámina es importante verificar que la muestra es apta para ser utilizada para diagnóstico. Para ello, es necesario cerciorarse que cumple con ciertas condiciones de calidad:

-Elaboración: debe estar bien ubicada en la lámina portaobjetos, distribución homogénea de la sangre y grosor adecuado de la gota gruesa (debe poder leerse las letras de un texto a través de la gota gruesa). Esto se obtiene al utilizar la plantilla y al utilizar la cantidad de sangre recomendada para preparar la gota gruesa.

-Deshemoglobinización: Debe ser completa, los glóbulos rojos al perder la hemoglobina ya no son visibles, solo se observan los leucocitos y las plaquetas. Un fondo azul claro o escasos restos de estromas de eritrocitos son normales luego de la tinción de la gota gruesa. De esta manera, en una muestra positiva los parásitos quedan en forma libre y serán más fácilmente identificados.

-Coloración: En una muestra bien teñida las formas celulares (leucocitos y plaquetas), toman las coloraciones características. Esto garantiza que en una muestra positiva las estructuras que conforman los parásitos también tomarán las coloraciones adecuadas para su correcta identificación:

- Plaquetas: se observan con gránulos rojizos
- Leucocitos: núcleo azul intenso a violeta, se observan los citoplasmas
- Gránulos de los leucocitos: coloración típica según tipo de leucocito: neutrófilo, eosinófilo o basófilo

Se debe utilizar un tiempo de coloración suficiente para observar las características anteriores. Si los elementos de la sangre no tienen esos colores, es poco probable que la cromatina o el citoplasma de los parásitos tome la coloración adecuada, lo cual puede provocar errores diagnósticos. Los elementos de la sangre y los parásitos viejos o destruidos permanecen en general con una coloración pobre.

Una lámina con problemas de coloración podría observarse decolorada, precipitada, ácida (muy azul) o básica (muy rosada).

Una lámina puede observarse decolorada cuando no se utiliza concentración adecuada de colorante o el tiempo de coloración utilizado fue muy corto.

Una lámina precipitada se observa cuando se utiliza cristalería sucia para preparar la solución de coloración, si no hubo filtración del colorante previo a la tinción, o cuando no se toma el colorante del sobrenadante sino del fondo de la botella. La presencia de precipitado abundante puede dificultar la lectura microscópica.

Láminas ácidas o básicas se deben generalmente a problemas con el buffer de fosfatos, también es posible observar láminas con coloraciones inadecuadas cuando el tiempo de coloración fue más corto de lo necesario

Una muestra con adecuado grosor, distribución, deshemoglobinización y coloración se considera apta para diagnóstico.

5.11.2 Presencia o ausencia de *Plasmodium* sp.

El diagnóstico de malaria inicia con la lectura de la gota gruesa, pues al ser una concentración de sangre, es la ideal para determinar la presencia o ausencia del parásito.

Para determinar si una gota gruesa es negativa o positiva por malaria se debe leer toda la muestra, realizando un recorrido sistemático, pues esto garantiza detección del parásito en presencia de bajas parasitemias (Figura 3). El recorrido debe iniciar donde se ubica la “x” avanzando hacia arriba, luego muévase un campo hacia la derecha y continúe en dirección de las flechas según lo indica la Figura 3

Esto es fundamental pues nuestro país se encuentra en vías de eliminación de la malaria. Hacer una revisión detallada de la gota gruesa también facilita la probabilidad de detección de infecciones mixtas, donde una especie puede ser más predominante que la otra.

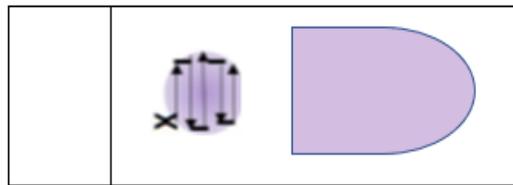


Figura 3. Recorrido para la lectura de la gota gruesa

Una muestra es considerada negativa si hay ausencia de morfologías de *Plasmodium* sp. en la gota gruesa. Una muestra es positiva si se observan morfologías concordantes con *Plasmodium* sp.

5.11.3 Identificación de especie parasitaria

En muestras positivas, la identificación de la especie parasitaria es importante para dirigir el tratamiento. De acuerdo con las características morfológicas del parásito observadas en la muestra teñida con Giemsa es posible identificar la especie parasitaria

Los parásitos de *Plasmodium* sp. pasan por una serie de estadíos y muestran las siguientes características en sus componentes:

-Cromatina: es un componente del núcleo del parásito, es usualmente redonda u ovalada y se colorea de un color rojo intenso a violeta.

-Citoplasma: demuestra una serie de formas durante el proceso de maduración del parásito. Se colorea de azul, aunque la intensidad de azul puede variar entre diferentes especies del parásito.

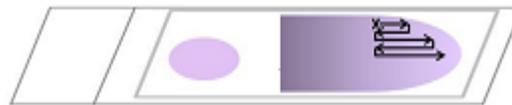
-Pigmento: es un subproducto de la utilización de la hemoglobina por parte del parásito. No se tiñe con el colorante, sino que tiene su color propio característico, que puede variar entre dorado, café hasta negro.

-Punteado: como efecto del crecimiento del parásito, la membrana del eritrocito puede sufrir ciertos cambios que se evidencian como puntos o hendiduras. El más comúnmente reconocido se llama punteado de Schüffner y se observa como puntos finos de tonalidad rosada en los glóbulos rojos parasitados con *Plasmodium vivax* o *Plasmodium ovale*.

Ciertas características morfológicas clave del glóbulo rojo infectado y de los parásitos pueden ser usadas para orientar el diagnóstico hacia alguna de las especies de *Plasmodium*, sin embargo, estas características no son absolutas, el diagnóstico final debe basarse en hallazgos combinados de varias características.

La identificación de características morfológicas específicas del parásito se puede observar en la gota gruesa al observar los distintos estadios presentes y se complementan con la lectura de la parte final (cola) del frotis sanguíneo (Figura 4), donde se puede visualizar más detalladamente características morfológicas tanto del parásito como de los glóbulos rojos parasitados, siendo así un apoyo a la identificación de la especie.

La lectura de la cola del frotis sanguíneo se inicia en la "x", muévase según lo indica la Figura 4 con el fin de realizar un recorrido sistemático y no repetir campos.



b. Diagram for examining the thin film

Figura 4. Recorrido para lectura de frotis sanguíneo

5.11.4 Estadios del *Plasmodium* sp.

En una muestra de sangre podemos encontrar los siguientes estadios:

-Trofozoíto: Es el estadio que se encuentra con mayor frecuencia. Al trofozoíto en su estado más temprano se le denomina "anillo" el cual con el tiempo se convertirá en un trofozoíto maduro. A medida que va madurando aumenta el tamaño de la cromatina y del citoplasma y es más probable visualizar el pigmento malárico, el cual es un producto del metabolismo del parásito.

-Esquizonte: Cuando el parásito inicia su proceso de reproducción asexual por medio de división celular, se convierte en esquizonte. Se pueden encontrar esquizontes con dos fragmentos de cromatina hasta otros más maduros con más de veinte fragmentos de cromatina. Se conoce como esquizogonía al proceso mediante el cual se forman los esquizontes, tanto en la sangre (esquizogonía sanguínea) como en el hígado (esquizogonía hepática).

-Gametocito: Es la fase sexual del parásito, el cual se encargará de iniciar el proceso de reproducción sexual en el mosquito mediante la unión del gametocito hembra (macrogametocito) y el gametocito macho (microgametocito) en el intestino del vector.

5.11.5 Especies de *Plasmodium* sp.

Es importante recordar que para observar una morfología parasitaria adecuada es necesario que la gota gruesa y frotis hayan sido elaborados a partir de sangre fresca. El parásito se deforma con el tiempo al permanecer en un tubo con EDTA y los cambios morfológicos pueden confundir al microscopista en la identificación de la especie.

5.11.5.1 Morfología de *Plasmodium vivax*

Ver fotografías en anexo 2.

Características generales

- Esta especie infecta preferentemente a glóbulos rojos inmaduros (reticulocitos), por lo tanto, al observar glóbulos rojos infectados en un frotis sanguíneo éstos se ven más grandes que los no infectados. Esta característica es especialmente importante para diferenciarlo de *P. malariae*
- Al observar una lámina positiva, es frecuente identificar todos los estadios parasitarios.
- De forma general, produce parasitemias menos elevadas que las de *P. falciparum*
- En las muestras de gota gruesa es posible observar parásitos con una ligera sombra color rosado que recuerda el glóbulo rojo que se encontraba infectando. A ese efecto que se observa con mayor frecuencia en *Plasmodium vivax* se le llama “halo de Schuffner”, sin embargo, no es exclusivo de esta especie y no se observa en todas las tinciones.

Características observadas en los estadios de *P. vivax*:

- Trofozoíto: El trofozoíto joven o anillo es muy difícil de diferenciar de los anillos de otras especies, sin embargo, a medida que el trofozoíto va creciendo y madurando, el citoplasma se vuelve amiboide, irregular y fragmentado. Generalmente se observa un único punto de cromatina y en los estadios más jóvenes es posible observar la presencia de vacuola. A medida que el trofozoíto crece, es posible identificar también la presencia de pigmento café-amarillo, el cual se observa generalmente fino y disperso por todo el parásito. La multiparasitemia no es infrecuente. Si la parasitemia permite identificar parásitos en el frotis, se observan glóbulos rojos infectados agrandados y ocasionalmente con punteado de Schuffner.
- Esquizontes: Cuando han alcanzado su madurez, se observan como agrupaciones irregulares de 12 a 24 cromatinas (merozoítos). Sin embargo, es posible observar esquizontes con menor cantidad de merozoítos que corresponden a estadios inmaduros.

- Gametocitos: Es una estructura generalmente redonda y agrandada. Si se observa en frotis se notará que llena prácticamente todo el eritrocito. Posee una cromatina única y bien definida y la vacuola está ausente. El pigmento se observa fino y disperso.

5.11.5.2 Morfología de *Plasmodium falciparum*

Ver fotografías en anexo 2.

Características generales

- Debido al fenómeno de citoadherencia que ocurre con esta especie, en sangre periférica solo observaremos los trofozoítos más jóvenes (anillos) y gametocitos, el resto de estadios quedan atrapados en la microvasculatura.
- Es común observar multiparasitemia y altas parasitemias.
- El glóbulo rojo infectado se ve del mismo tamaño que el resto de los eritrocitos y generalmente sin punteado.

Características observadas en los estadios de *P. falciparum*:

- Trofozoíto: Se pueden encontrar formas en coma, formas marginales, formas en audífono (con dos puntos de cromatina). Es poco común observar pigmento pues normalmente las formas son aún muy jóvenes.
- Esquizonte: Normalmente no se observa en sangre periférica, su presencia se asocia a altas parasitemias y a presentaciones clínicas severas o crónicas. Cuando está maduro tiene de 12-30 merozoítos.
- Gametocito: En su forma madura toma forma de semiluna o salchicha, tiene un solo punto de cromatina ubicado en la zona central. El pigmento oscuro, grueso y concentrado, se ubica en el centro, a veces sobre la cromatina. Su presencia en sangre indica que la infección tiene una semana o más de haber iniciado.

5.11.5.3 Morfología de *Plasmodium malariae*

Ver fotografías en anexo 3.

Características generales

Los parásitos comparten muchas características morfológicas con *Plasmodium vivax*, por ejemplo, también se pueden observar todos los estadios en sangre periférica, sin embargo, los glóbulos rojos infectados no se ven agrandados y tampoco se observan con punteado.

Características observadas en los estadios de *P. malariae*:

- Trofozoíto: pueden observarse algunos trofozoítos que se extienden de un lado a otro del eritrocito, formando una banda (trofozoítos en banda)
- Esquizonte: En el caso de los esquizontes, cuando están maduros suelen tener de 6-12 merozoítos, los cuales pueden disponerse ocasionalmente alrededor de la masa de pigmento

café oscuro simulando una margarita (esquizonte en margarita). El hallazgo de esquizontes con mayor número de merozoítos nos hace pensar en otra especie parasitaria.

- Una manera de diferenciarlo fácilmente de *P. vivax* es buscar en el frotis glóbulos rojos parasitados, pues en esta especie el glóbulo rojo infectado se ve de tamaño normal o un poco más pequeño, mientras que en *P. vivax* se observan glóbulos rojos infectados más grandes que los no infectados.

5.11.5.4 Morfología de *Plasmodium ovale*

Ver fotografías en anexo 3.

Características generales

Morfológicamente es muy semejante a *P. vivax*, se presenta un glóbulo rojo infectado agrandado, punteado en la membrana, el cual puede ser un poco más intenso que en *P. vivax*, puede producir recaídas (reactivación de hipnozoítos).

Aproximadamente un 20 % de los glóbulos rojos infectados se observan también ovalados y algunos pueden tener “fimbrias”. El esquizonte maduro no llega a tener más de 12 merozoítos.

5.11.6 Conteo parasitario o densidad parasitaria

La densidad parasitaria se relaciona con la severidad de la infección, permite evaluar la evolución clínica del paciente y es el parámetro objetivo que se utiliza para evaluar la respuesta al tratamiento. Permite detectar a tiempo la posibilidad de estar frente a una cepa resistente y realizar el cambio de tratamiento de ser necesario.

Se realiza una determinación de la misma antes de iniciado el tratamiento y como seguimiento durante el transcurso del mismo, evidenciando una caída de la parasitemia que culmina con eliminación completa de los parásitos en sangre cuando el tratamiento ha sido efectivo.

Cuando se detecta un caso de malaria se realiza el conteo parasitario inicial el cual es una línea base, luego se realizan conteos parasitarios sucesivos (controles post-tratamiento), en los cuales la parasitemia disminuye a través del tiempo demostrando efectividad del tratamiento. Si no es así, debe investigarse la causa de la falla y de ser requerido ajustar o cambiar el tratamiento.

Los controles de seguimiento deben realizarse según se establece en el Protocolo de vigilancia para malaria y estrategia nacional para la eliminación y la prevención del restablecimiento de la transmisión de malaria en Costa Rica, disponible en la página web del Ministerio de Salud.

Procedimiento para realizar el conteo parasitario

Para realizar el conteo parasitario se requiere de un contador de células hematológico (hemocitómetro) y una calculadora.

- Iniciando en la parte inferior izquierda de la gota gruesa, ubique un campo donde se observe un buen número de leucocitos y alguna forma parasitaria para empezar el recuento (Figura 3).
- Utilizando el contador de células (hemocitómetro), cuente los parásitos y los leucocitos observados en cada campo, pulse una tecla del contador para registrar los leucocitos y otra tecla para registrar los parásitos observados.
- Muévase al siguiente campo y continúe con el recuento de los campos microscópicos siguientes. Se debe tener cuidado de realizar un recorrido sistemático de forma tal que durante el conteo no se repitan campos (Figura 3).
- Es posible encontrar campos con solo glóbulos blancos o parásitos, los cuales deben incluirse en el recuento.
- En infecciones por *P. falciparum* se cuentan solo los estadios asexuados, las formas sexuales se notifican, pero no se cuentan. Para el resto de especies parasitarias se cuentan todos los estadios juntos (asexuados y sexuados).
- En las infecciones mixtas se reportan las especies presentes y se realiza el conteo parasitario de cada especie por separado. El valor epidemiológico de la infección mixta está dado porque su elevada frecuencia en un área malárica indica un alto grado de transmisión. El diagnóstico adecuado de una infección mixta es de suma importancia para la elección del tratamiento y el seguimiento del paciente. La infección mixta más frecuente es la asociación de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Para saber el momento en que finaliza el conteo siga los siguientes criterios:

- Si al llegar a 200 leucocitos, ha contado ≥ 100 parásitos, deje de contar y aplique la fórmula para determinar la densidad parasitaria
- Si al llegar a 200 leucocitos ha contado ≤ 99 parásitos, **continúe hasta llegar a 500 leucocitos** y aplique la fórmula para determinar la densidad parasitaria.
- Cuando los parásitos duplican la cantidad de leucocitos, el conteo se da por terminado al llegar a 500 parásitos y se aplica la fórmula para determinar la densidad parasitaria.
- Contabilice todos los parásitos y leucocitos en el último campo, aunque la cifra de leucocitos contados sea mayor de 200 o 500.
- Registre el número real de parásitos y leucocitos contabilizados al momento de finalizar.
- Una vez terminado el recuento, calcule la densidad parasitaria basándose en la cifra real de leucocitos del paciente. Si no dispone de ella, utilice una estimación media de 6000 leucocitos/ μ l de sangre.

- En el caso de infecciones por *P. falciparum*, registre además la presencia o ausencia de gametocitos, sin contabilizarlos.

Haga el cálculo aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{Parásitos}/\mu\text{l (p}/\mu\text{l)} = \frac{\# \text{ de parásitos contados}}{\# \text{ de leucocitos contados}} \times \text{Factor (conteo leucocitario del paciente)}$$

NOTA: Si se tiene el dato del conteo leucocitario del paciente, se utiliza este último como factor, caso contrario se utiliza 6 000. Si el resultado es un número con decimales, se redondea al número entero más cercano.

Es importante recalcar que si se utiliza el factor de 6 000 para hacer el conteo inicial (antes de tratamiento), se debe seguir utilizando esta cifra para los subsecuentes conteos de control post-tratamiento. Lo mismo aplica si se utiliza el conteo leucocitario del paciente. Esto con el fin de no introducir un factor de error en el seguimiento de la eficacia del tratamiento.

Ejemplo 1:

En una infección por *P. vivax* se contaron los siguientes parásitos totales

Parásitos contados: 150

Leucocitos contados: 200

Se aplica la fórmula:

$$\text{Parásitos}/\mu\text{l} = \frac{150}{200} \times 6\,000 = 4\,500$$

Resultado:

Gota gruesa positiva por *P. vivax*

Conteo parasitario= 4 500 p/μl

Recuerde que en el caso de *P. vivax* no tiene relevancia reportar la presencia/ausencia de gametocitos

Ejemplo 2:

En una infección por *P. falciparum* se contaron los siguientes estadíos asexuales

Parásitos contados: 300

Leucocitos contados: 500

Además, no se observaron gametocitos

Se aplica la fórmula:

$$\text{Parásitos}/\mu\text{l} = \frac{300}{500} \times 6\,000 = 3\,600$$

Resultado:

Gota gruesa positiva por *P. falciparum*

Conteo parasitario= 3 600 p/μl

No se observaron gametocitos

Recuerde que en el caso de *P. falciparum* sí es relevante reportar la presencia/ausencia de gametocitos

Conteo parasitario en frotis sanguíneo

Se aplica en parasitemias excesivamente altas (≥ 100 parásitos por campo) donde debido a la gran cantidad de parásitos se complica realizar el conteo en gota gruesa. Esto podría suceder por ejemplo, con infecciones severas por *P. falciparum*.

- En la parte inferior del frotis (cola), localice un campo que no tenga glóbulos rojos sobrepuestos.
- Haga un promedio de glóbulos rojos en tres campos con distribución de células.
- Posteriormente, calcule el número de campos que se deben observar para contar 10 000 glóbulos rojos. Este cálculo supone que un campo microscópico con la distribución de glóbulos seleccionada tiene el promedio de glóbulos rojos encontrado en el cálculo. De manera que, si un campo tiene el promedio de glóbulos rojos encontrado, se establece la pregunta: ¿cuántos campos se deben observar para alcanzar 10 000 glóbulos rojos?

Por ejemplo: Si tenemos un promedio de 250 glóbulos rojos por campo, decimos:

Si un campo tiene 250 glóbulos rojos, cuantos campos tengo que contar para alcanzar 10000 glóbulos rojos:

1 campo \longrightarrow 250 glóbulos rojos
X campos \longrightarrow 10 000 glóbulos rojos

$$X = \frac{1 \times 10\,000}{250}$$

$$X = 40$$

Se tiene entonces que se deben contar 40 campos.

- Si hay eritrocitos infectados por *P. falciparum* con formas asexuadas, registre todos los que están parasitados. Si observa formas sexuadas (gametocitos), no las cuente, pero regístrelas.
- Para las otras especies parasitarias registre los estadios asexuados y sexuados conjuntamente.
- En infecciones mixtas, se reportan las especies presentes y se contabilizan por separado los parásitos de cada una.
- Conociendo el número de campos a contar, inicie el conteo en la misma zona donde se estableció el promedio y con un contador de células marque en una tecla el número de campos contados y en otra el número de glóbulos rojos parasitados contados. Realice un

recorrido sistemático tal como lo indica la Figura 4 para asegurarse no repetir campos, iniciando en la posición de la letra “x” y continuando como lo indican las flechas.

- Al finalizar el conteo, se aplica la fórmula:

$$\text{Conteo parasitario} = \frac{\# \text{ parásitos} \times \# \text{ de glóbulos rojos} / \mu\text{l de sangre}}{10\,000 \text{ glóbulos rojos}}$$

- Debido a que el promedio de glóbulos rojos por microlitro de sangre es de aproximadamente 5 000 000/ μl , se utiliza este dato como estándar y la fórmula se simplifica así:

$$\text{Conteo parasitario} = \# \text{ parásitos} \times 500$$

Donde **# parásitos** corresponde al número de parásitos contados en los 10 000 glóbulos rojos.

- El resultado se reporta en parásitos/ μl (p/ μl)
- Si el resultado es un número con decimales, se redondea al número entero más cercano.

Ejemplo:

Si se contaron 50 parásitos en 10 000 glóbulos rojos,

$$\text{Conteo parasitario} = 50 \times 500 = 25\,000 \text{ p}/\mu\text{l}$$

- Aunque no se utiliza con frecuencia, si fuese requerido el porcentaje de glóbulos rojos parasitados (Parasitemia), se puede obtener de la siguiente manera: Conociendo el número de glóbulos rojos parasitados en 10 000 glóbulos rojos se calcula su equivalencia en 100 glóbulos. De esta forma se obtiene el resultado en porcentaje.

Interpretación: parasitemias mayores al 5 % son consideradas hiperparasitemias, donde la vida del paciente corre peligro.

Ejemplo:

Se observaron 100 glóbulos rojos infectados en 10 000 glóbulos rojos, entonces

$$\begin{array}{l} 100 \text{ parásitos} \longrightarrow 10\,000 \text{ glóbulos rojos} \\ X \text{ parásitos} \longrightarrow 100 \text{ glóbulos rojos} \end{array}$$

$$X = (100 \times 100) / 10\,000 = 1$$

Por lo tanto, la parasitemia es 1 %.

5.12 Reporte de resultados

Una muestra negativa por malaria se reporta:

No se observa *Plasmodium* sp.

Para muestras positivas se determina la especie infectante y se reporta el conteo parasitario como línea base al momento del diagnóstico. Posteriormente, se realizan sucesivos conteos parasitarios en los controles post-tratamiento (según se establece en la normativa nacional) para verificar su eficacia.

Es importante recordar que todo caso de malaria debe ser notificado de **forma obligatoria y a la mayor brevedad**. La notificación debe incluir el diagnóstico completo, es decir, el resultado de presencia/ausencia de *Plasmodium* sp. obtenido por el laboratorio que realizó el diagnóstico, la especie y conteo parasitario. Reporte la presencia/ausencia de gametocitos en caso de *P. falciparum*. **Recuerde que el diagnóstico completo lo realiza el laboratorio local**. Para más detalles sobre la notificación, consulte los lineamientos nacionales en el Protocolo de vigilancia para malaria y estrategia nacional para la eliminación y la prevención del restablecimiento de la transmisión de malaria en Costa Rica.

Para infecciones por *P. falciparum* se agrega el comentario: “Se observaron gametocitos/No se observaron gametocitos”, según corresponda a presencia o ausencia de estadíos sexuales.

En infecciones por otras especies distintas de *P. falciparum* no se agrega ningún comentario relativo a gametocitos pues se cuentan parásitos totales.

En infecciones por *P. falciparum* la presencia de gametocitos tiene relevancia clínica y epidemiológica pues indica que la infección tiene más de una semana de evolución. Para el resto de especies no tiene relevancia clínica reportar gametocitos pues se producen uno o dos días después de iniciada la infección, por lo que no se notifican en el reporte, sin embargo, se cuentan con el resto de parásitos.

Ejemplo 1:

Gota gruesa positiva por *Plasmodium falciparum*

Conteo parasitario: 4 500 p/μl

No se observaron gametocitos

Ejemplo 2:

Gota gruesa positiva por *Plasmodium vivax*

Conteo parasitario: 10 000 p/μl

5.13 Aseguramiento de la calidad

El aseguramiento de la calidad garantiza la confiabilidad en los resultados que se generan en el laboratorio. Se realiza día a día durante el trabajo rutinario cuando el personal involucrado en el diagnóstico de malaria conoce y trabaja el ensayo según los lineamientos técnicos establecidos e implementa las correcciones correspondientes al detectar desvíos.

5.13.1 Función del Inciensa

El Centro Nacional de Referencia de Parasitología tiene a su cargo la función de velar por la calidad del diagnóstico de malaria. Para ello, realiza dos actividades: el control de calidad indirecto y el control de calidad directo. La participación de los laboratorios de la red diagnóstica de malaria en estas dos actividades **es obligatoria**, según lo establece la normativa nacional. Además, esta participación forma parte de los indicadores de medición utilizados para considerar que el país logró la eliminación de la malaria.

5.13.2 Control de calidad indirecto

- Se realiza cuando los laboratorios de la red diagnóstica envían mensualmente al CNRP el 10 % de las láminas con diagnóstico negativo y el 100 % de las láminas con diagnóstico positivo para que el CNRP realice una relectura de las mismas y emita un informe de concordancia.
- Se envían también láminas de gota gruesa y frotis con resultados discordantes con la PDR.
- Los seguimientos post-tratamiento rutinarios se excluyen del control de calidad indirecto. Sin embargo, se envían para control de calidad las láminas de seguimiento en las cuales el laboratorio reporta la presencia de estadios asexuales una vez se ha terminado el tratamiento, para verificar si ha ocurrido una reactivación del ciclo.

Periodicidad:

Las láminas negativas deben enviarse durante la primera semana del mes vencido, es decir, primera semana del mes siguiente al análisis de las muestras. En el caso de las láminas positivas deben enviarse, como máximo una semana después de su diagnóstico.

Se debe reportar al CNRP Inciensa, el total de muestras positivas y negativas analizadas en cada laboratorio cada mes, pues es necesario contar con esta información actualizada con esta misma periodicidad.

Si el laboratorio no recibió solicitudes de gota gruesa durante el mes, lo debe informar al CNRP utilizando el mismo formulario o bien por correo electrónico al microbiólogo encargado de malaria. De esta manera se actualiza en la base de datos el cumplimiento del laboratorio con este control de calidad.

Sangre EDTA de muestras positivas:

En el caso de muestras positivas procedentes de búsqueda pasiva, adicionalmente se solicita a los laboratorios enviar al Inciensa, un tubo de sangre total con EDTA, recolectado antes del inicio del tratamiento.

Es indispensable que esta muestra de sangre sea enviada tan pronto sea posible, con el fin de evitar la alteración en la morfología parasitaria, la cual se altera entre 24 h y 48 h de recolección en EDTA. Debe permanecer a temperatura ambiente.

Esta sangre servirá para elaborar material de referencia (lotes de gota gruesa y frotis). Este insumo es de gran importancia para el CNRP pues permite mantener un banco de láminas que se utilizan para actividades de capacitación y para el Programa de Evaluación del Desempeño en el Diagnóstico Microscópico de Malaria (PEEDM).

En caso de estudios moleculares, contactar previamente al envío al encargado de malaria del CNRP para valorar el caso. Estas pruebas se recomiendan para situaciones donde la microscopía no sea suficiente para hacer el diagnóstico.

Condiciones para el envío de las láminas:

- Las láminas enviadas no deben contener aceite de inmersión y el número de identificación de la muestra debe ser claramente visible.
- Las láminas analizadas durante el trabajo cotidiano no se descartarán hasta que se hayan seleccionado las que se van a enviar para el control de la calidad, por lo que deben almacenarse libres de aceite de inmersión, protegidas del polvo, luz directa e insectos. Nunca debe limpiarse el aceite frotando la lámina con toallas pues la muestra puede dañarse o desprenderse. Deben dejarse reposar boca abajo sobre hojas de papel bond no impresas (libres de tinta) para que el aceite se absorba.
- Cada lámina debe contener gota gruesa y frotis teñidos con Giemsa y debe estar identificada de la misma manera como se indica en el formulario que la acompaña.
- Las láminas no deben traer escrito el resultado del laboratorio, el mismo debe indicarse únicamente en el formulario.
- El formulario que se utiliza para enviar el control de calidad indirecto es el Incienssa-R94 que se descarga de la página web de Incienssa.
- El llenado se puede hacer de forma física o digital y el establecimiento debe asegurarse de utilizar el formulario vigente (descargado de página web), evitando utilizar versiones antiguas obsoletas. Toda la información que solicita el formulario es requerida para el análisis de datos que realiza el CNRP, por lo que es importante no dejar espacios en blanco.
- El Incienssa-R94 debe contener la información completa del diagnóstico (positivo/negativo), incluir la especie y el conteo parasitario (será necesario incluir también con cada lámina positiva el recuento leucocitario con que se realizó el cálculo). Reporte la presencia/ausencia de gametocitos en caso de *P. falciparum*. **Recuerde que el diagnóstico completo lo realiza el laboratorio local.**
- Las láminas deben venir embaladas de tal manera que se proteja su integridad y no se quiebren durante el traslado al Incienssa.
- Con el fin de completar las bases de datos nacionales de estadísticas y del control de calidad indirecto en las cuales se monitorea mensualmente el cumplimiento de cada laboratorio con este tipo de control de calidad, debe llenarse de forma completa el formulario con toda la información solicitada.

5.13.2.1 Selección de las láminas para control de calidad

La selección de las láminas negativas debe ser al azar y la técnica de selección debe evitar sesgos. Con este fin, la selección de las láminas negativas debe realizarse del registro del laboratorio y no de las cajas de almacenamiento. En el caso de las láminas positivas no aplica método de selección pues se envían todas para control de calidad.

5.13.2.2 Lectura doble ciego

El microscopista del CNRP que hace la lectura de las láminas no conoce el resultado (sistema de lectura doble ciego), por ello es importante que no se escriba el resultado sobre la lámina. En caso de concordancia entre el resultado del laboratorio local y el de referencia, se emite el informe. En caso de discordancia, la lámina pasa a ser analizada por un tercer microscopista del Laboratorio de Referencia preferiblemente el microbiólogo responsable de malaria, para resolver la misma.

Se reportará el resultado concordante entre dos de los tres microscopistas. Al resolverse la discordancia se valida el resultado y se procede a introducir los datos en el sistema de información para elaborar el informe.

5.13.2.3 Informe de concordancia del control de calidad indirecto

El CNRP emitirá, dentro de las dos semanas posteriores a la recepción de las muestras, un informe de concordancia entre los resultados reportados por el laboratorio local y el Laboratorio de Referencia (CNRP). Todos los informes serán notificados: i) al laboratorio mediante correo electrónico de la persona encargada (jefatura o regente) y ii) al correo malaria@misalud.go.cr, además de a otro u otros correos oficiales aportados por parte del Ministerio de Salud. Por tanto, es responsabilidad de cada uno de los laboratorios de la red nacional públicos y privados, mantener al día su información de correos autorizados al Inciensa para la notificación de los informes del CNRP.

Además, en el caso de la C.C.S.S., se enviará de forma mensual un informe consolidado por región o grupo de laboratorios al Supervisor Regional de Microbiología o, en su defecto, a la Coordinación Nacional de Laboratorios Clínicos. Este retorno será dentro de las tres semanas posteriores al mes vencido.

Es importante que el laboratorio revise detenidamente el informe pues contiene retroalimentación para la mejora del diagnóstico microscópico de malaria. **El laboratorio debe conservarlo y tenerlo accesible en caso de que sea solicitado por autoridades de salud o en auditorías. Se recomienda guardarlo en una carpeta digital por mes y año.**

El informe establece la concordancia para los parámetros de detección (resultado positivo/negativo) y la identificación de especie, además de la evaluación cualitativa de la calidad

de la gota gruesa. La información relacionada a la calidad de las láminas debe ser evaluada por el establecimiento para tomar medidas correctivas en caso necesario, en pro de la mejora continua.

Las fórmulas utilizadas para determinar las concordancias son:

Concordancia de resultado = (láminas concordantes en resultado/total láminas evaluadas)*100

Concordancia de especie = (láminas concordantes en especie/total láminas positivas evaluadas)*100

El informe posee un link que redirige a la página del Inciensa, donde el participante puede comparar la calificación de su desempeño en la detección parasitaria y la identificación de especie con los valores esperados según OMS, así como las acciones para la mejora de la calidad de las láminas. (Anexos 5 y 6)

5.13.3 Control de calidad directo

Al menos una vez al año el CNRP del Inciensa organiza el Programa de Evaluación Externa del Desempeño del Diagnóstico Microscópico de Malaria (PEEDM) y lo ofrece a su red de laboratorios.

La evaluación se compone de un grupo de láminas incógnitas con gota gruesa y frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa que se envía a cada laboratorio participante. Luego de la lectura de las láminas, cada laboratorio emite una respuesta con la que se evalúa su desempeño en detección del parásito, identificación de especie, estadios presentes y conteo parasitario.

Cada ronda de evaluación tiene un documento de Instrucciones para el participante donde se indica qué parámetros serán evaluados en dicha ronda.

Si bien, el control directo emite un informe por laboratorio el cual será validado por un microscopista responsable de malaria, se recomienda que posteriormente a la evaluación y a lo interno del laboratorio, se utilice el material para que todos los microscopistas involucrados con diagnóstico de malaria puedan hacer lectura de las láminas y refrescar sus conocimientos. Esta práctica ayuda a mantener la competencia de todo el personal involucrado con el diagnóstico microscópico.

Al finalizar la ronda de evaluación, cada laboratorio participante recibe un informe individual con los resultados de su desempeño que incluye una evaluación de concordancias individuales y desempeño general. También se emite un informe colectivo que permite visualizar y comparar el desempeño de toda la red y que se publica en la página web del Inciensa. Ambos informes incluyen recomendaciones con el fin de propiciar la mejora continua.

El informe individual es enviado por el CNRP a los laboratorios participantes en esta actividad, quienes deben conservarlo y tenerlo accesible en caso de que sea solicitado por autoridades de salud o en auditorías. Los informes colectivos se pueden acceder desde la página web del Inciensa, ruta: Aseguramiento de la Calidad_Informes de Evaluación Externa del Desempeño

Fórmulas para cálculo de concordancias:

$[(\text{Suma total puntos obtenidos por el participante por indicador}) / (\text{Puntaje total por indicador})] * 100$

Para las láminas negativas, así como para las positivas, se calcula la concordancia de detección. Las concordancias de especie, estadio y conteo parasitario solamente se calculan para las láminas positivas

6. Documentación relacionada

Inciensa-R94 Control de calidad indirecto del diagnóstico microscópico de malaria.

7. Anexos

Anexo 1. Plantilla para la elaboración de gota gruesa y frotis sanguíneo en lámina esmerilada

Anexo 2. Características morfológicas de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*

Anexo 3. Características morfológicas de *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*

Anexo 4. Claves para identificar especies de *Plasmodium* sp. que causa malaria en humanos

Anexo 5. Calificación del desempeño en la detección parasitaria y la identificación de especie

Anexo 6. Acciones para la mejora de la calidad de las láminas

Anexo 7. Estandarización de lotes de colorante de Giemsa

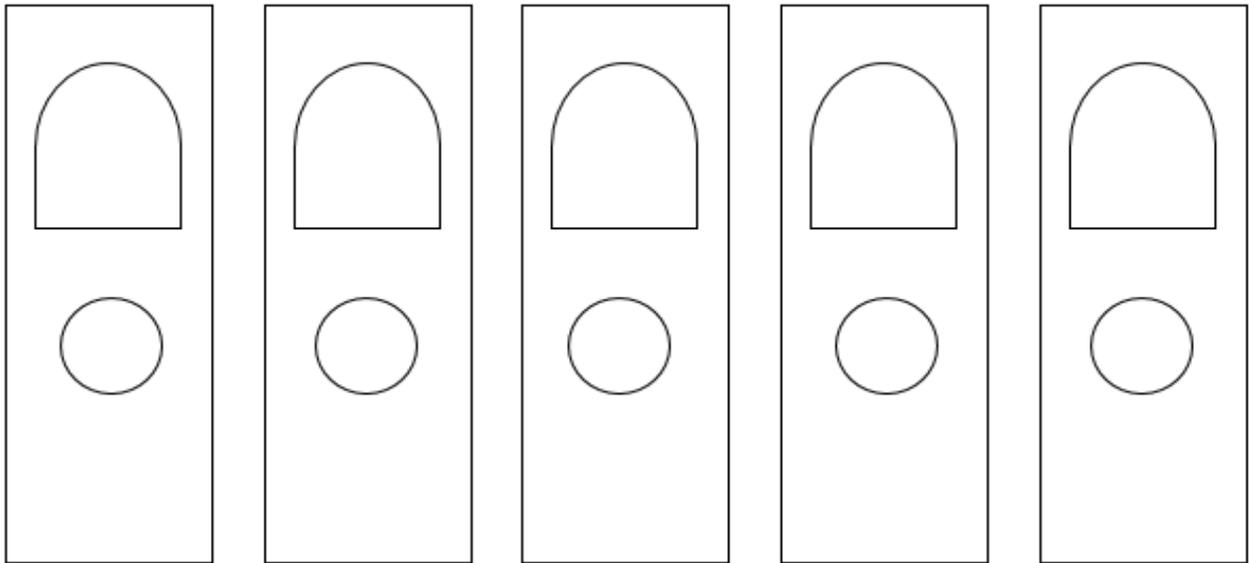
Anexo 8. Uso del microscopio

8. Bibliografía

1. World Health Organization (WHO). World malaria report 2023. Global Malaria Programme (GMP). Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240086173>
2. Ministerio de Salud de Costa Rica, Organización Panamericana de la Salud (OPS), Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS), Instituto Costarricense de Enseñanza e Investigación en Nutrición y Salud (INCIENSA). Protocolo de vigilancia para malaria y estrategia nacional para la eliminación y prevención del restablecimiento de la transmisión de malaria en Costa Rica, versión 2, 2023. Disponible en: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos-left/documentos-ministerio-de-salud/vigilancia-de-la-salud/normas-protocolos-guias-y-lineamientos/enfermedades-de-transmision-vectorial-1/malaria-1>
3. World Health Organization (WHO). Malaria Microscopy Quality Assurance Manual. Versión 2. 2016. Disponible en: <https://www.who.int/docs/default-source/documents/publications/gmp/malaria-microscopy-quality-assurance-manual.pdf>

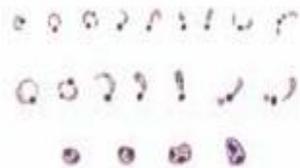
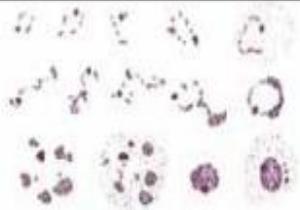
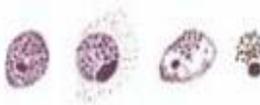
4. Bases del diagnóstico microscópico del paludismo. Parte I. Guía del alumno, 2014. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/bases-diagnostico-microscopico-paludismo-parte-i-guia-alumno-2a-ed-2014>
5. Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia Técnica Mundial contra la malaria 2016-2030. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/186671/9789243564999_spa.pdf?sequence=1
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Medios auxiliares para el diagnóstico microscópico del paludismo. Disponible en: <https://iris.who.int/handle/10665/44264>
7. World Health Organization (WHO). WHO malaria terminology, 2021. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240038400>
8. World Health Organization (WHO). A framework for malaria elimination, 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IG: Geneva. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241511988>

Anexo 1

Plantilla para confección de gota gruesa y frotis en lámina esmerilada

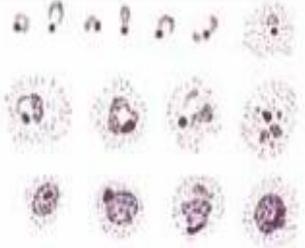
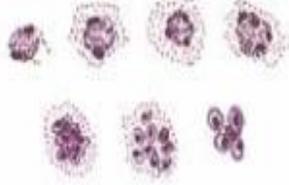
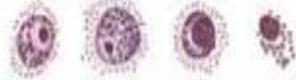
NOTA: Se recomienda tener una copia de esta plantilla impresa y emplastificada en cada laboratorio para ser utilizada en la elaboración de la gota gruesa y frotis sanguíneo

Anexo 2
Características morfológicas de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*

Especies		Trofozoito	Esquizonte	Gametocito
Plasmodium falciparum Generalmente se observan trofozoitos jóvenes en crecimiento y/o gametocitos maduros	 <p>Tamaño: pequeño a medio. Número: a menudo elevado. Forma: frecuentemente en anillo y en coma. Cromatina: a menudo dos puntos. Citoplasma: regular, fino o carmoso. Formas maduras: a veces presentes en el paludismo grave, compactas, con pigmento en unos cuantos granos gruesos o en una masa.</p>	 <p>Generalmente asociado a muchas formas en anillo. Tamaño: pequeño, compacto. Número: escaso, infrecuentes, generalmente en el paludismo grave. Formas maduras: 12-30 o más merozoitos en conglomerados compactos. Pigmento: masa oscura única.</p>	 <p>Formas inmaduras en punta poco frecuentes. Formas maduras: redondeadas o en banana. Cromatina: única, bien definida. Pigmento: disperso, grueso, en forma de granos de arroz; cuerpo de extrusión rosa a veces presente. Se observan a menudo formas erosionadas que solo tienen cromatina y pigmento.</p>	
	Plasmodium vivax Se observan todas las fases; puntado de Schüffner en los filamentos de los glóbulos rojos huecos, especialmente en los bordes de la extensión	 <p>Tamaño: pequeño a grande. Número: escaso a moderado. Forma: anillos rotos y formas irregulares frecuentes. Cromatina: única, ocasionalmente doble. Citoplasma: irregular o fragmentado. Formas maduras: compactas, densas. Pigmento: disperso, fino.</p>	 <p>Tamaño: grande. Número: escaso a moderado. Formas maduras: 12-24 merozoitos, generalmente 16, en conglomerados irregulares. Pigmento: masa suelta</p>	 <p>Formas inmaduras difíciles de distinguir de los trofozoitos maduros. Formas maduras: redondas, grandes. Cromatina: única, bien definida. Pigmento: disperso, fino. Formas erosionadas con escaso o nulo citoplasma y solo con cromatina y pigmento.</p>

Fuente: Bases del diagnóstico microscópico del paludismo. Parte I. Guía del alumno.2014

Anexo 3
Características morfológicas de *Plasmodium ovale* y *Plasmodium malariae*

<i>Plasmodium ovale</i> Se observan todas las fases; puntuado de Schüffner muy marcado en los finísimos de los glóbulos rojos huésped, especialmente en los bordes de la extensión	 <p> Tamaño: puede ser más pequeño que <i>P. vivax</i>. Número: generalmente escaso. Forma: en anillo o redondeada, compacta. Cromatina: única, destacada. Citoplasma: bastante regular, carmoso. Pigmento: disperso, grueso. </p>	 <p> Formas inmaduras difíciles de distinguir de los trofozoitos maduros. Formas maduras: redondas, pueden ser más pequeñas que <i>P. vivax</i>. Cromatina: única, bien definida. Pigmento: disperso, grueso. Formas erosionadas que solo muestran cromatina y pigmento. </p>	 <p> Tamaño: similar a <i>P. malariae</i>. Número: escaso. Formas maduras: 4-12 merozoitos, generalmente 8, en un conglomerado suelto. Pigmento: masa concentrada. </p>
<i>Plasmodium malariae</i> Se observan todas las fases	 <p> Tamaño: pequeño. Número: generalmente escaso. Forma: en anillo o redondeada, compacta. Cromatina: única, grande. Citoplasma: regular, denso. Pigmento: disperso, abundante, con tinte amarillento en las formas más viejas. </p>	 <p> Tamaño: pequeño, compacto. Número: generalmente escaso. Formas maduras: 6-12 merozoitos, generalmente 8, en un conglomerado suelto, algunos aparentemente sin citoplasma. Pigmento: concentrado. </p>	 <p> Formas inmaduras y algunas formas maduras difíciles de distinguir de los trofozoitos maduros. Formas maduras: redondas, compactas. Cromatina: única, bien definida. Pigmento: disperso, grueso, puede tener distribución periférica. Formas erosionadas solo con cromatina y pigmento. </p>

Fuente: Bases del diagnóstico microscópico del paludismo. Parte I. Guía del alumno.2014

Anexo 4
Claves para identificar especies de *Plasmodium* sp. que causa malaria en humanos

Glóbulos rojos (GR) infectados		
Tamaño	Forma	Granulaciones de Schuffner
PF: N PV: >> N PM: <N, N PO: >N	PF: Medialuna (gametocitos) PV: Ameboide PO: Con fimbrias o elongado	PV, PO

N: Tamaño normal, PF: *P. falciparum*, PV: *P. vivax*, PM: *P. malariae*, PO: *P. ovale*

Parásitos hallados en sangre circulante			
Anillos	Trofozoítos	Esquizontes (maduro)	Gametocitos
Anillos solamente: (± gametocitos): PF Numerosos PF Infección múltiple del GR: PF Más de un punto de cromatina: PF Delicados: PF	Ameboide: PV Compacto: PO, PM PF (raramente vistos) Formas en banda: PM	6-12 núcleos; rosetas: PM 4-12 núcleos: PO 12-24: PV 12-30: PF (raramente vistos)	Medialuna: PF Redondo: PV, PO, PM

PF: *P. falciparum* PV: *P. vivax* PO: *P. ovale* PM: *P. malariae*

Anexo 5. Calificación del desempeño en la detección parasitaria y la identificación de especie

Calificación del desempeño en la detección parasitaria y la identificación de especie			
Calificación	Porcentaje de concordancia		Acción
	Detección parasitaria	Identificación de especie	
Excelente	>=95%	>=85%	Se felicita al personal por su excelente desempeño
Muy bueno	85% a 94%	75 % a 84 %	Se felicita al personal por su buen desempeño y se le insta a mantenerlo. Identifique aspectos para la mejora
Bueno	75 % a 84%	65% a 74%	El laboratorio ha realizado un buen trabajo pero hay aspectos por mejorar. Se recomienda revisar competencia de personal, calidad del reactivo de Giemsa y del microscopio. Identifique si hay necesidad de entrenamientos para fortalecer capacidades.
Malo	<= 75%	<=65 %	Se requiere acciones inmediatas para la mejora
			Se recomienda supervisiones inmediatas al personal
			Debe revisarse la competencia del personal
			Debe considerarse entrenamiento inmediato e intensivo
			Revisar calidad del reactivo de Giemsa y del microscopio
			Realizar seguimiento a las acciones correctivas implantadas.

Fuente: OMS. Diagnóstico microscópico del paludismo. Manual de aseguramiento de la calidad. Segunda edición.

Calificación del desempeño en la detección parasitaria y la identificación de especie". Dicha calificación aplica para un número de 10 o más láminas acumuladas. Puede además consultar las "Acciones de mejora para deficiencias en la calidad de las láminas"

Anexo 6. Acciones para la mejora de la calidad de las láminas

Acciones para la mejora de la calidad de las láminas	
Parámetro deficiente	Recomendación
Distribución	Utilice la plantilla para la elaboración de la gota gruesa y frotis. Revise recomendaciones de confección en el documento Procedimiento Operativo Estandar para el diagnóstico microscópico de malaria CNRP-LM-PE05 disponible en la página web de Inciensa
Espesor	Revise la cantidad de sangre utilizada para la elaboración de la gota gruesa. Revise recomendaciones de confección en el documento Procedimiento Operativo Estandar para el diagnóstico microscópico de malaria CNRP-LM-PE05 disponible en la página web de Inciensa
Coloración	Para problemas en la tonalidad de la coloración (Básico o Ácida), verifique pH del buffer de fosfatos
	Para problemas de precipitado, asegúrese de filtrar la solución antes de teñir. No agite la botella de colorante, se toma del sobrenadante. Cambie de reactivo si ya está por acabarse, no se recomienda utilizar colorante del fondo de la botella.
	Para láminas decoloradas revise dilución del colorante (10%) y verifique si es necesario ajustar el tiempo de coloración para lograr mejores resultados.
Deshemoglobinización	Revise tiempo de secado, temperatura de secado (no debe sobrepasar los 60 °C). Evite que la gota gruesa tenga contacto con alcohol o sus vapores. Revise recomendaciones de confección en el documento Procedimiento Operativo Estandar para el diagnóstico microscópico de malaria CNRP-LM-PE05 disponible en la página web de Inciensa

Anexo 7. Estandarización de lotes de colorante de Giemsa

N° Lote del kit: _____

Fecha del análisis: _____

Responsable: _____

Microscopio (placa): _____

A partir de una solución de coloración al 10% de Giemsa en buffer 1X se analizaron los resultados de tinción con los siguientes tiempos de coloración:

Tiempo de coloración (min)	Resultados				
	Deshemoglobinización		Coloración		
	Completa	Incompleta	Adecuada	Inadecuada	Observaciones

Se determina que para el uso cotidiano de este lote de colorante se debe utilizar un tiempo de coloración de _____ minutos.

Observaciones:

Responsable de aprobación: _____

Fecha de aprobación: _____

