

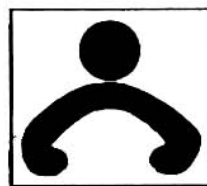


MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS
DE SALUD PUBLICA



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TECNICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE MALARIA

Red Nacional de Laboratorios de Salud



**MINISTERIO
DE SALUD**

**SERIE DE :
NORMAS TÉCNICAS N° 14**

Segunda Edición / Lima, Diciembre 1997



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS
DE SALUD PUBLICA



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TECNICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE MALARIA

Red Nacional de Laboratorios de Salud



**MINISTERIO
DE SALUD**

**SERIE DE :
NORMAS TÉCNICAS N° 14**

Segunda Edición / Lima, Diciembre 1997

© Segunda Edición
Ministerio de Salud
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
Jr. Cápac Yupanqui 1400, Jesús María
Telf. 471-3254 / Fax: 471-7443
Lima, Perú, 1997

Diseño e impresión: Art. Lautrec S.R.Ltda.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TECNICOS PARA EL DIAGNOSTICO DE MALARIA

COMITÉ DE REDACCIÓN:

Lic. T.M. Blanca Pardave Lugo

Blga. Cecilia Arce Barboza

Blga. Sonia Gutierrez Gonzáles

COMITÉ EDITOR:

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

Dr. César Cabezas Sánchez

Dr. Carlos Carrillo Parodi

Dr. Jaime Chang Neyra

MINISTERIO DE SALUD ALTA DIRECCIÓN

Dr. Marino Costa Bauer

Ministro

Dr. Alejandro Aguinaga Recuenco

Viceministro

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Dr. Carlos Carrillo Parodi

Jefe

CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD

Dr. César Cabezas Sánchez

Director General

PERFIL DE LOS AUTORES

Lic. T.M. Blanca Pardavé Lugo

Lic. Tecnólogo Médico en Laboratorio Clínico

Laboratorio de Malaria, División de Parasitología, Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, INS, MINSA.

Blgo. Cecilia Arce Barboza

Bióloga

Laboratorio de Malaria, División de Parasitología, Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, INS, MINSA.

Blgo. Sonia Gutierrez Gonzales

Bióloga, Microbióloga, Parasitóloga

Laboratorio de Zoonosis, División de Parasitología, Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, INS, MINSA.

PERFIL DE LOS EDITORES

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

Médico Cirujano, Doctor en Farmacología

Director General, Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud, MINSA

Profesor Principal, Sección Farmacología, Departamento Académico de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia

Miembro, Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humbolt”, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Dr. César Cabezas Sánchez

Médico Cirujano, Master en Medicina, Especialista en Enfermedades Infecciosas y Tropicales

Director General, Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, MINSA.

Profesor invitado de Medicina Tropical, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Dr. Carlos Carrillo Parodi

Médico Cirujano, Doctor en Medicina

Profesor Principal, Departamento Académico de Microbiología, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Jefe, Instituto Nacional de Salud

Dr. Jaime Chang Neyra

Médico Cirujano, Master of Science in Community Health in Developing Countries

Director Ejecutivo de Certificación y Garantía de la Calidad, Centro Nacional de Control de Calidad, Instituto Nacional de Salud, MINSA

Investigador, Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humbolt”, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Agradecimientos:

El Comité Editor expresa su agradecimiento al Sr. Blgo. Jorge Valle Toledo, por su colaboración en la redacción y preparación de los gráficos de la obra; y a los señores doctores Humberto Guerra Allison y César Naquira Velarde, por la colaboración brindada en la revisión del mismo.

La edición de este Manual se efectuó en el marco del Convenio de Cooperación suscrito entre el Instituto Nacional de Salud y la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

ÍNDICE

Presentación	9
Resolución Jefatural	11
CAPITULO I	
INTRODUCCION	13
CAPITULO II	
OBTENCION DE LA MUESTRA HEMATICA	17
2.1 Toma de la muestra hemática	17
2.2 Registro de datos	16
CAPITULO III	
METODOS DE PREPARACION DE LA GOTA GRUESA Y DEL FROTIS EN LA LAMINA	23
3.1 Gota Gruesa	23
3.2 Frotis	23
3.3 Secado de las muestras hemáticas	25
3.4 Fallas comunes al preparar las muestras hemáticas	25
CAPITULO IV	
COLORACION DE LA MUESTRA DE SANGRE	27
4.1 Uso del colorante Giemsa	27
4.2 Coloración de las muestras	28
4.3 Coloración del frotís	34
CAPITULO V	
OBSERVACION MICROSCOPICA	37
5.1 Recomendaciones	37
5.2 Reconocimiento de los Plasmodia	37
5.3 Aspectos del parásito de Malaria en sus diferentes estadios	37
5.4 Apariencia de especies de parásitos en frotís de sangre	39
5.5 Apariencia de los parásitos en gota gruesa	39
5.6 Elementos que pueden confundirse con parásitos en las muestras de sangre	40
5.7 Examen de rutina de la gota gruesa y del frotís	40
CAPITULO VI	
DETERMINACION DE LA DENSIDAD PARASITARIA	47
6.1 Consideraciones generales	47
6.2 Métodos de determinación de densidad parasitaria	47
6.3 Determinación de la densidad en caso de malaria por Plasmodium falciparum	49
CAPITULO VII	
CONTROL DE CALIDAD EN MICROSCOPIA DE MALARIA	51
7.1 Consideraciones generales	51
7.2 Tipos de supervisión	51
7.3 Procedimientos técnicos para el control de calidad de	

gota gruesa	52
CAPITULO VIII	
CULTIVO IN VITRO DE Plasmodium falciparum	55
8.1 Equipo	55
8.2 Reactivos	55
8.3 Materiales	56
8.4 Preparación de medios y otros	56
8.5 Procedimientos para el aislamiento de parásitos en pacientes infectados por Plasmodium falciparum	58
8.6 Cambios de Medio de Cultivo	58
8.7 Criopreservación o congelamiento	59
8.8 Determinación del porcentaje de parasitemia en frotís sanguíneo	60
CAPITULO IX	
SEROLOGIA DE MALARIA	61
9.1 Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	61
9.2 Técnica de Inmuno Absorción Enzimática (ELISA)	66
CAPITULO X	
TECNICAS IN VIVO / IN VITRO PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE Plasmodium falciparum A LAS DROGAS ANTIMALARICAS	75
10.1 Introducción	75
10.2 Criterios de Inclusión	75
10.3 Criterios de Exclusión	75
10.4 Procedimientos	76
10.5 Preparación de la lámina	76
10.6 Examen de las láminas	76
10.7 Conteo de parásitos	76
10.8 Procedimiento Prueba In Vivo	76
10.9 Procedimiento Prueba In Vitro	79
10.10 Evaluación de la excreción urinaria de cloroquina (Prueba de Dill y Glasko)	81
10.11 Evaluación de la excreción urinaria de sulfonamidas (Prueba de Bratton-Marshall modificada)	82
10.12 Medicamentos estudiados	83
10.13 Registro de resultados	83
10.14 Interpretación de resultados	84
CAPITULO XI	
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	85
CAPITULO XII (ANEXOS)	
Anexo 1	
Precoloración de la gota gruesa	91
Anexo 2	
Preparación de reactivos y de colorante	95
Anexo 3	
Limpieza y almacenaje de láminas portaobjeto	99
Anexo 4	
Preparación de reactivos para procesamiento de muestras	

mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	101
Anexo 5	
Solicitud para Investigación de Malaria por gota gruesa	107
Anexo 6	
Ficha de Supervisión de Malaria en el Laboratorio del Nivel Local	109
Anexo 7	
Registro de Resultados para la Prueba IFI	113
Anexo 8	
Seguimiento específico In vivo de casos de Malaria tratados	115
Anexo 9	
Formulario para detallar la situación de cada persona en la Prueba In vivo	117
Anexo 10	
Formulario de los ensayos In vivo / In vitro para determinar la sensibilidad de Plasmodium a los medicamentos antipalúdicos	119

PRESENTACIÓN

La Malaria o Paludismo, enfermedad causada por protozoarios parásitos del género *Plasmodium*, es una de las enfermedades que mayor morbilidad y mortalidad originan en el mundo. En el Perú, la Malaria ocurre tanto en la Costa como en los valles interandinos y en la Selva. Las tres especies que la causan son *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*. De éstas, las dos primeras, resultan relevantes: *P. vivax* por su frecuencia, ya que es la responsable del mayor número de casos de Malaria reportados a nivel nacional, mientras *P. falciparum* es importante por la severidad potencial de la enfermedad que causa, la que puede llegar a ser mortal, así como por la frecuencia con que este parásito es resistente a los medicamentos antimaláricos más comunes.

Luego de un período durante el cual disminuyeron notablemente la morbilidad y la mortalidad asociadas a la Malaria en el país, ella, ha retornado importancia como un problema de Salud Pública. Ello, debido a la reaparición o incremento de la transmisión *P. vivax* en extensas áreas y a la reaparición y expansión de la transmisión de *P. falciparum* en extensas zonas hasta hace poco libres de esta enfermedad.

Por ello, en el marco de la estrategia del control de la Malaria propuesta por el Ministerio de Salud, el Instituto Nacional de Salud, organismo técnico normativo de la Red Nacional de Laboratorios de Salud, pone este manual a disposición del personal de Salud, con la finalidad de contribuir en el logro del objetivo de diagnosticar y tratar correcta y oportunamente la enfermedad, así como apoyar la actividad de vigilancia epidemiológica.

El manual incluye normas para la obtención y el envío de muestras para diagnóstico de Malaria, y hace énfasis en el empleo de las técnicas de diagnóstico para el nivel local (frotís, gota gruesa). Asimismo, se revisa las técnicas empleadas en los laboratorios intermedios y referencial (cultivo, IFI, ELISA, y las pruebas de susceptibilidad a las drogas antimaláricas), incorporando directivas generales para el envío de las muestras a través de los laboratorios la Red, con fines de diagnóstico, confirmación y/o control de calidad.

EL COMITÉ EDITOR

SECTOR SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



No. 252-95-J-OPD-INS

RESOLUCION JEFATURAL

Lima, 12 de *Diciembre* de 1995

CONSIDERANDO :

Que, el Instituto Nacional de Salud, a través de su Centro Nacional de Laboratorios en salud Pública ha formulado manuales normativos relativos a procedimientos técnicos de diagnóstico de Sífilis, Malaria, Peste, Leishmaniasis, así como para la toma y envío de muestras para diagnóstico de laboratorio en enfermedades infecciosas y envenenamientos.

Que en tal virtud resulta necesario aprobar y difundir dichos manuales, para su utilización y observancia.

De conformidad con lo dispuesto en el Reglamento de Organización y Funciones del INS, aprobado por R.M. N° 178-95-SA/DM; y

Estando a lo acordado:

SE RESUELVE:

Artículo 1º.- Aprobar los siguientes manuales normativos pertenecientes a la Serie de Normas Técnicas del Instituto Nacional de Salud:



- a) Manual de Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico Serológico de Sífilis.
- b) Manual de Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico de Malaria.
- c) Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Peste
- d) Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Leishmaniasis
- e) Manual de Procedimientos de Laboratorio para la obtención y envío de muestras.

Artículo 2º.- Disponer la impresión y distribución de los documentos a que se refiere el numeral anterior.

Regístrese y comuníquese.



DR. CARLOS CARRILLO PARODI
JEFE
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 La enfermedad y su diagnóstico

La Malaria o Paludismo, es una enfermedad causada por un protozoo del género *Plasmodium* y transmitida por un mosquito o zancudo del género *Anopheles*.

En el Perú, existen tres especies de *Plasmodium* capaces de infectar al hombre: *P. vivax*, *P. falciparum*, y *P. malariae*. Aunque la mayor parte de los casos registrados por el Ministerio de Salud corresponden a infección por *P. vivax*, desde hace algunos años se viene incrementando el número de casos de infección por *P. falciparum*, la que se asocia a una forma más grave de malaria.

Los síntomas predominantes de la enfermedad son malestar general, escalofríos, fiebre, sudoración y cefalea, los que luego de instalado el cuadro general, se presentan como accesos separados por períodos relativamente libres de molestias.

En el organismo humano, el parásito se ubica en un ambiente intracelular, invadiendo glóbulos rojos, hepatocitos, etc. Desde el punto de vista diagnóstico, su búsqueda y observación es más fácil en los glóbulos rojos circulantes contenidos en una muestra de sangre periférica. Las técnicas más utilizadas para este fin son: el examen de la “gota gruesa” y el del frotís, utilizando la coloración Giemsa, las que se describen en este manual.

Para el diagnóstico serológico de malaria se utiliza las técnicas de ELISA e IFI, las cuales se describen en este manual, así como las pruebas de susceptibilidad a las drogas antimaláricas dada su importancia por la creciente aparición de resistencia del parásito a estas drogas.

En el Fluxograma N° 1 se muestran los métodos de diagnóstico de malaria empleados en la práctica clínica y en estudios epidemiológicos.

1.2 Uso del manual

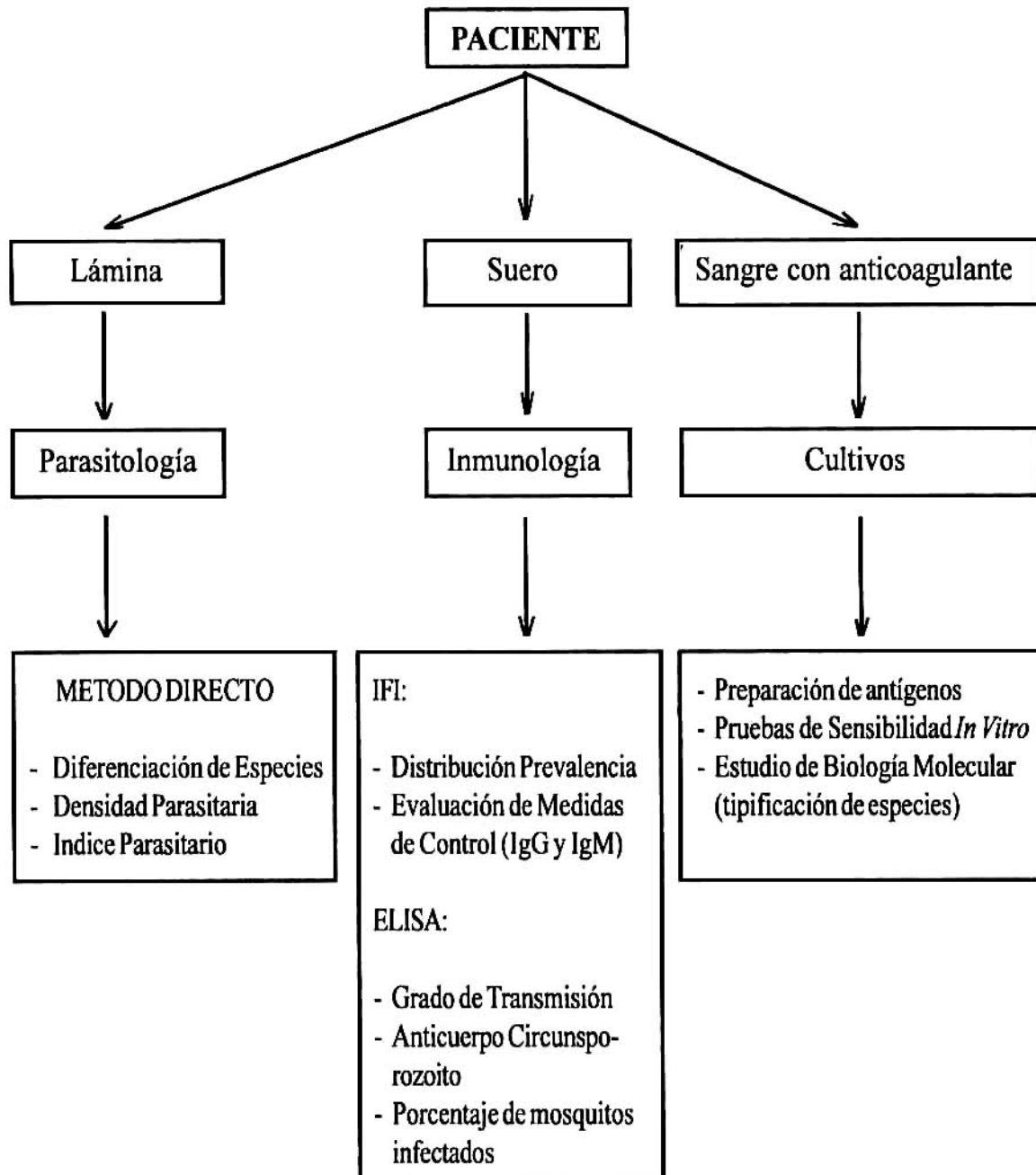
El contenido de este manual, está estructurado de la siguiente manera:

- Una sección de recomendaciones y características generales.
- Secciones correspondientes a cada uno de los procedimientos, compuestas por:
 - a) Condiciones, recomendaciones y características específicas del procedimiento; e
 - b) Indicaciones para la ejecución del procedimiento.

Se recomienda leer el manual periódicamente para verificar que se está realizando los procedimientos, adecuadamente, y siempre que se tenga alguna duda sobre los procedimientos que se describen en este manual.

FLUXOGRAMA N° 1

METODOS DE DIAGNOSTICO DE MALARIA EMPLEADOS EN LA PRACTICA CLINICA Y EN ESTUDIOS EPIDEMIOLOGICOS



CAPITULO II

OBTENCION DE LA MUESTRA HEMATICA

2.1 TOMA DE LA MUESTRA HEMATICA

2.1.1 Objetivo de la toma de muestra hemática

La muestra de sangre periférica se obtiene para preparar dos clases de película de sangre, una gruesa y una delgada, la *gota gruesa* y el *frotis* respectivamente, para su examen por microscopía directa.

La *gota gruesa* está conformada por numerosas capas de células sanguíneas, en su mayoría glóbulos rojos, los que son deshemoglobinizados durante la coloración Giemsa. Esta concentración de glóbulos rojos facilita la detección de los parásitos que pudieran estar presentes en el interior de alguno de ellos.

El *frotis* consiste de una capa delgada, única, de células sanguíneas. Esto facilita la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes en los glóbulos rojos.

2.1.2 Recomendaciones

Registre los datos del paciente en la forma apropiada antes de obtener la muestra de sangre.

Manipule las láminas sosteniéndolas entre los dedos por los bordes o por una esquina para evitar ensuciar la superficie con el sudor y la grasa de la piel.

2.1.3 Practique las medidas de bioseguridad

La obtención y el procesamiento de muestras de sangre exponen al operador al riesgo de infectarse con agentes patógenos transmitidos por la sangre (tales como virus de hepatitis, virus de la inmunodeficiencia humana, etc.).

Este riesgo, se puede reducir si se toman las siguientes precauciones:

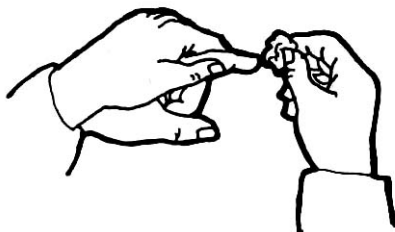
- Evitar tener contacto con la sangre, incluyendo el que se deslice por los dedos o las manos. Usar guantes protectores cuando se manipula sangre.
- Cubrir cualquier corte o abrasión de las manos con adhesivos.
- Cuidar de no punzarse o cortarse con cualquier instrumento o material que haya estado en contacto con sangre.
- Lavarse siempre las manos con agua y jabón después de completar cualquier tarea que involucre manipulación de sangre.
- Si la sangre tuviera contacto con su piel, lavar el área afectada con agua y jabón y limpiar con algodón humedecido con alcohol.
- Nunca utilizar las lancetas o las agujas más de una vez. Descartarlas colocándolas inmediatamente después de su utilización en un recipiente resistente a impactos (metal o plástico), de paredes rígidas destinado para este fin.
- Cualquier material contaminado con sangre, deberá ser colocado en un envase con cloro o hipoclorito de sodio (lejía) al 1 % y; luego, para mayor seguridad se deberá disponer su entierro o incineración.

2.1.4 Procedimiento

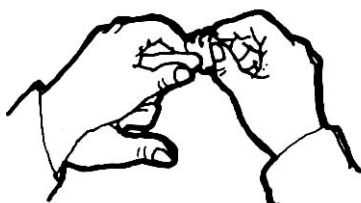
- a. Sostenga la mano izquierda del paciente, con la palma hacia abajo, y seleccione el tercer dedo a partir del pulgar o el dedo índice; para esto haga que el paciente extienda el dedo seleccionado y flexione los demás (en niños pequeños, use el dedo gordo del pie).



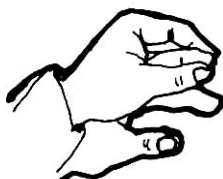
- b. Limpie el dedo con una pieza o torunda de algodón ligeramente humedecida en alcohol para retirar la suciedad y la grasa de la yema del dedo.



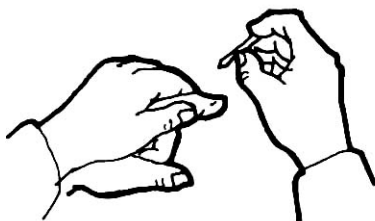
- c. Seque el dedo con un algodón limpio, estimulando la circulación de la sangre con unos golpecitos suaves, pero firmes.



- d. Sostenga el dedo del paciente con la mano izquierda, tomándolo por sus lados y manteniendo una suave presión sobre ellos para favorecer la salida de sangre.



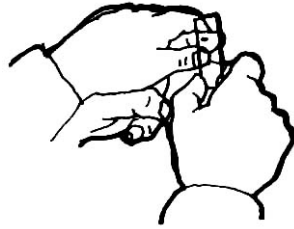
- e. Puncie la yema del dedo con una lanceta estéril. Hágalo con un movimiento rápido.



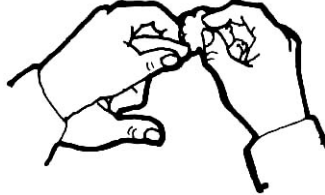
- f. Deje salir la primera gota de sangre y límpiela con una torunda de algodón seca. Asegúrese que ninguna hilacha de algodón permanezca en el dedo, que pueda mezclarse posteriormente con la sangre.



- g. Colecte dos gotas de sangre de la siguiente manera:
Ponga en contacto el primer tercio externo de la superficie de una lámina con la sangre. Esta gota es para preparar la gota gruesa.
Luego, ponga en contacto el tercio medio de la superficie de la lámina con la sangre. Esta gota es para preparar el frotís.



- h. Limpie la sangre restante del dedo con una torunda de algodón humedecida en alcohol, e indique al paciente que la presione contra el lugar de la punción por 5 minutos.



2.2 REGISTRO DE DATOS

Para asegurar la fácil localización de los pacientes, es importante, consignar toda la información requerida en el “Registro de muestras para investigación de Malaria” que tiene por objeto conocer:

- La Región, Sub-Región, Provincia, Distrito y localidad donde se obtuvo la muestra.
- La ciudad o localidad donde vive el paciente.
- La calle y número de la casa donde vive el paciente.
- El nombre del paciente, su edad y sexo.
- Los resultados del examen microscópico.

Debe tomarse en cuenta que el registro correcto de los datos del paciente en el formato de Solicitud para investigación de Malaria por gota gruesa (Ver Anexo N° 5) es tan importante como la ejecución correcta del examen microscópico.

CAPITULO III

METODOS DE PREPARACION DE LA GOTA GRUESA Y DEL FROTIS EN LA LAMINA

Debe utilizar una lámina auxiliar.

3.1 GOTA GRUESA:

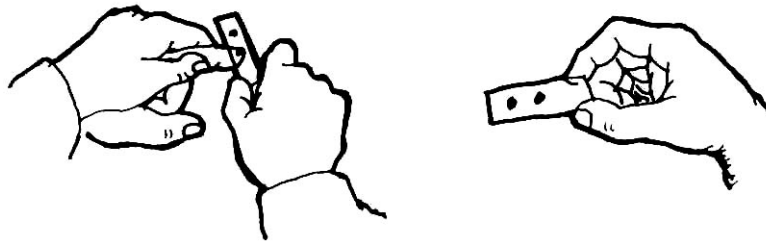
Sostenga, firmemente, la lámina donde se encuentran las gotas de sangre con una mano o colóquela sobre una superficie limpia.

Usando la otra mano, aplique una esquina de la lámina auxiliar sobre la gota de sangre destinada a la preparación de la gota gruesa, y revuelva con 6 movimientos circulares, de modo, que la sangre se distribuya uniformemente en un círculo de aproximadamente 1 cm de diámetro (o en un cuadrado de 1 cm de lado).

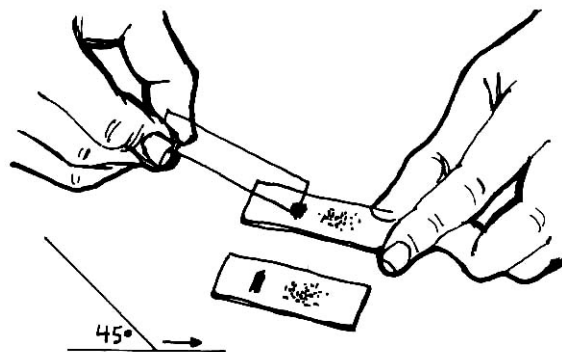
3.2 FROTIS:

Coloque la lámina con la muestra sobre una superficie limpia.

Ponga en contacto el borde de uno de los extremos de la lámina auxiliar con la superficie de la lámina donde se encuentra la muestra hemática, de modo que formen un ángulo de 45°, en un lugar, entre la segunda gota de sangre y el extremo limpio de la lámina.

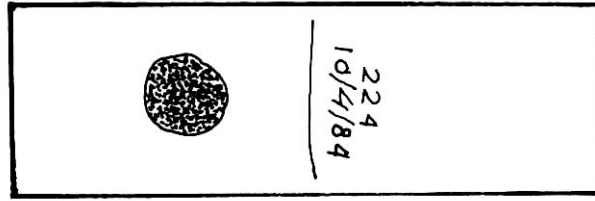


Aproxime el borde de la lámina auxiliar a la gota de sangre hasta tocarla solamente. Mantenga el ángulo de 45° y evite barrer la sangre.



Deje que se distribuya sangre entre el borde de la lámina auxiliar y la superficie de la lámina con la muestra.

Haga correr el borde de la lámina auxiliar sobre la superficie de la lámina con la muestra desde la gota hacia el extremo opuesto a la gota gruesa, manteniendo el contacto entre las láminas en un ángulo de 45°.



La lámina utilizada como auxiliar para preparar la gota gruesa y el frotis puede ser utilizada para colocar sobre ella, la siguiente muestra y otra lámina limpia del paquete se usará como lámina auxiliar en su preparación. Nunca utilice la misma lámina auxiliar para preparar más de una muestra.

3.3 SECADO DE LAS MUESTRAS HEMATICAS

Deje secar la lámina con la muestra hemática sobre una superficie plana protegida de los insectos, del polvo, de la luz solar directa y del calor extremo.

Identifique la lámina escribiendo con un lápiz de carbón suave en la parte más gruesa del frotis seco: el código de la muestra, número y la fecha. No utilice un bolígrafo para escribir en el frotis.

Si no va a realizar la tinción, el examen bajo microscopio en el lugar de la toma de muestra, envuelva la lámina seca en el formato de registro del paciente y envíela al laboratorio tan pronto como sea posible.

En climas húmedos y cálidos, la autofijación de las muestras ocurre muy rápidamente. Por ello, deben ser coloreadas cuanto antes, a más tardar 3 días luego de su obtención. Cuando un tiempo largo de almacenamiento es inevitable, las muestras deberán ser deshemoglobinizadas y someterse al tratamiento de precoloración. (Ver Anexo N° 1).

3.4 FALLAS COMUNES AL PREPARAR LAS MUESTRAS HEMATICAS

La preparación incorrecta de la muestra hemática puede impedir efectuar el etiquetado, la coloración, el examen, o más de uno de estos procesos.

Las fallas más comunes, que deben evitarse son:

3.4.1 *Situar las gotas de sangre en la lámina inadecuadamente*

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

3.4.2 *Colocar demasiada sangre en la lámina*

Después de colorear la lámina con demasiada sangre, la gota gruesa puede ser demasiado azul. Habrá demasiadas células blancas por campo y éstas pueden oscurecer o cubrir algunos parásitos de malaria presentes. Si el frotis es demasiado grueso, los glóbulos rojos pueden estar unos encima de otros imposibilitando el examen adecuado después de la fijación.

3.4.3 *Colocar muy poca sangre en la lámina*

Si se emplea poca sangre en la preparación de las muestras, no habrán suficientes células blancas por campo y no se examinará suficiente cantidad de sangre, disminuyendo la probabilidad de encontrar parásitos. El extendido puede ser muy pequeño y no podrá utilizarlo como etiqueta.

3.4.4 *Esparcir las muestras de sangre en una lámina con grasa*

En una lámina sin desengrasar, la sangre, se esparcirá irregularmente lo que hace muy difícil el examen. Además, puede producirse el desprendimiento de parte de la gota gruesa durante el proceso de coloración.

3.4.5 Usar una lámina auxiliar con el borde astillado

El frotís se esparce irregularmente y se forman muchas “colas”. La gota gruesa puede también ser afectada.

3.4.6 Preparar un frotís demasiado grande y ubicar mal la gota gruesa

Si el frotís es demasiado grande, la gota gruesa puede quedar fuera de lugar, muy cerca al borde de la lámina, dificultando su examen con el microscopio y favoreciendo que durante la coloración o el secado porciones de la gota gruesa se desprendan por contacto con otros objetos.

3.4.7 Otras fallas comunes

- Guardar las muestras en condiciones inadecuadas.
- Preparar las muestras sobre láminas mal lavadas o rayadas.
- No secar las muestras apropiadamente.
- Teñir las muestras mucho tiempo después de obtenerlas, lo que hace difícil la coloración y obtiene resultados insatisfactorios.

CAPITULO IV

COLORACION DE LA MUESTRA DE SANGRE

4.1 USO DEL COLORANTE GIEMSA

El colorante Giemsa, es una mezcla de eosina (tinte de rosado) y azul de metileno (tinte de azul); los que dan la coloración rosada y azul, respectivamente.

En la tinción de la muestra hemática se utiliza un colorante diluido, el que se prepara a partir de una solución madre. La preparación del colorante diluido y de la solución madre se describen en detalle en el Anexo N° 1.

Del frasco conteniendo la solución madre, tome el volumen necesario para 1 a 2 semanas de trabajo, y colocar en un frasco con gotero incorporado.

Mantenga el envase que contiene el resto de la solución madre Giemsa bien cerrado y en lugar seco, fresco y protegido de la luz solar directa. Así evitará la volatilización del solvente y la oxidación del colorante, y prolongará la duración de la solución.

El material de vidrio (probetas, balones, vasos, pipetas, cubetas, etc.), empleado en la coloración tiene que estar siempre seco antes de su uso.

El material de vidrio usado para guardar colorante Giemsa debe ser lavado en agua limpia inmediatamente después de ser utilizado para retirar los restos del colorante. El material usado debe remojarse por algún tiempo, preferiblemente toda la noche, en una solución de detergente y posteriormente, debe ser enjuagado totalmente en agua limpia. Los residuos de detergente en el material de vidrio pueden alterar el pH de su contenido y estropear el colorante.

Nunca añada agua a la solución madre del colorante. La cantidad de agua más pequeña puede provocar deterioro de la solución de modo que no colorea adecuadamente.

No agite la botella de colorante antes de utilizarla; se suspenderían pequeños cristales de colorante que no han sido disueltos, los cuales pueden colocarse en las muestras de sangre durante el proceso de coloración y dificultar el examen bajo el microscopio.

Nunca regrese el colorante diluido no utilizado al envase que contiene la solución madre.

4.2 COLORACION DE LAS MUESTRAS

4.2.1. Coloración de la gota gruesa:

Se usa dos métodos:

1. **Método rápido o en varilla:** para colorear de 1 a 10 láminas
2. **Método en bloque:** para colorear más de 10 láminas.

La elección de uno u otro, depende de la cantidad de láminas que se colorean, ya que el segundo, sólo facilita trabajar, simultáneamente, con un mayor número de láminas.

4.2.2. Recomendaciones para ambos métodos de coloración de la gota gruesa:

Asegúrese de que la gota gruesa y el frotis estén bien secos antes de iniciar el proceso de tinción.

Puede acelerar el secado empleando calor suave, por ejemplo, exponiéndolos al generado por una lámpara. Evite utilizar demasiado calor, ya que esto puede dificultar una adecuada coloración.

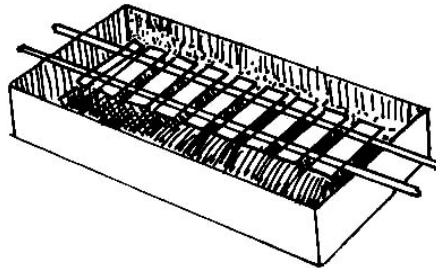
Antes de proceder a la coloración de la gota gruesa fije el frotís sumergiéndolo en metanol por 3 segundos y déjelo secar.

Asegúrese de preparar el volumen de colorante diluido suficiente para las láminas que debe colorear; (prepárelo antes de iniciar la coloración, vea el Anexo 2). Si usa el método en varilla, el volumen necesario promedio por lámina (gota gruesa y frotís) es 3.0 mL, pero si sólo se colorea la gota gruesa se requiere 1.5 mL . Por ejemplo, para colorear 10 láminas (gota gruesa) necesitará 15 mL de colorante diluido. Si usa el método en bloque, el volumen dependerá del tamaño de su recipiente y de la cantidad de láminas que debe colorear.

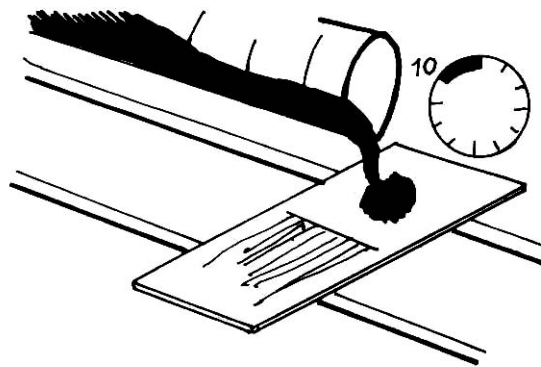
4.2.3 EL METODO RAPIDO O COLORACION EN VARILLA

4.2.3.a Procedimiento:

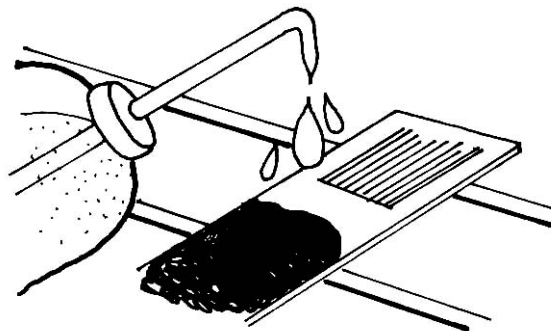
Coloque la varilla de vidrio sobre un lavatorio o recipiente, de tal forma, que facilite la eliminación de los líquidos que se usarán en la coloración. Coloque las láminas que debe colorear sobre la varilla, espaciándolas de modo que pueda manipularlas con seguridad.



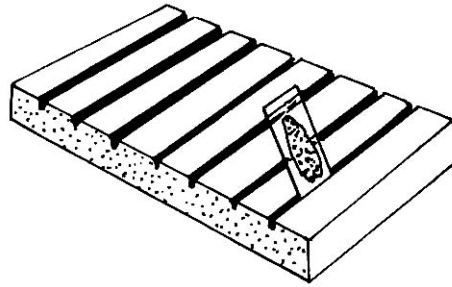
Vierta colorante diluido sobre la gota gruesa, cubriéndola completamente. Haga esto, suavemente, y desde una distancia corta de la lámina. Deje actuar el colorante por 10 minutos. La experiencia le puede indicar la necesidad de modificar este tiempo de espera.



Descarte el exceso de colorante diluido y lave la lámina con un chorro suave de agua corriente (por ejemplo, con una pisceta), hasta que el agua no desprenda colorante.



Coloque las láminas en una gradilla de madera, de modo que queden inclinadas y con la gota gruesa hacia abajo, evitando que la muestra toque algo. Deje secar las láminas en esta posición.



4.2.4 METODO EN BLOQUE

4.2.4.a Recomendaciones:

Use siempre el mismo recipiente (un Beaker o vaso de plástico) de diámetro y capacidad conocidas, de modo, que pueda calcular fácilmente la cantidad de láminas que pueden colocarse en posición vertical para ser coloreadas, y el volumen de colorante diluido necesario en cada caso.

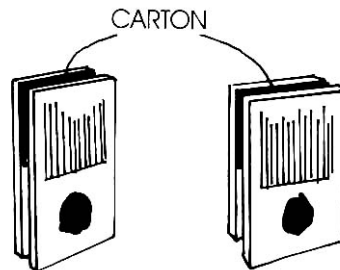
Asegúrese de tener suficientes tarjetas de cartón prensado (de 2 x 3 cm de área) para formar el bloque.

Evite mojar los cartones y los frotices.

4.2.4.b Procedimiento:

Forme un bloque con las láminas que debe colorear de la siguiente manera:

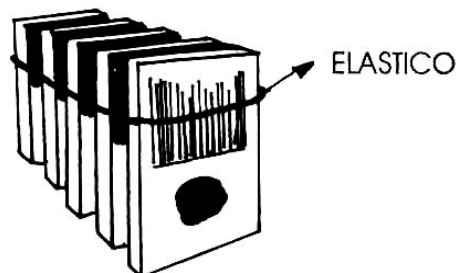
Forme una “pareja” con dos láminas, colocándolas una contra la otra, de manera que las superficies que contengan la muestra estén hacia afuera y la gota gruesa quede hacia abajo.



Forme otra “pareja” y júntela a la primera intercalando una tarjeta de cartón entre la parte superior de ambas, de modo, que el cartón no cubra las gotas gruesas.

Añada, sucesivamente, una nueva “pareja” a las anteriores, intercalando siempre y de la misma manera una tarjeta de cartón entre las “parejas”, hasta que haya formado un bloque del tamaño adecuado para su recipiente.

Asegure el bloque formado pasándole alrededor una liga o hilo de pabilo.

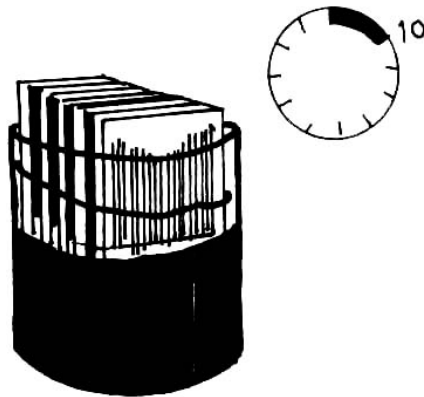


Introduzca el bloque en el recipiente que va a usar para la coloración y añada con cuidado agua destilada (o agua de lluvia, o agua hervida fría o solución amortiguadora de pH 7.2) suficiente para cubrir la gota gruesa de todas las láminas del bloque. Esto, le permitirá calcular el volumen de colorante diluido que deberá usar.

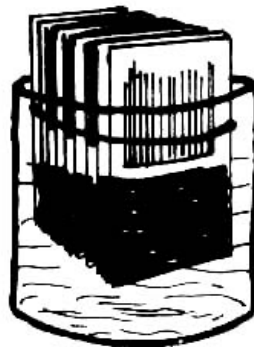


Retire el bloque del recipiente y determine el volumen de agua destilada (o del líquido que usó), agregue la cantidad en gotas de "Colorante Madre" requerido.

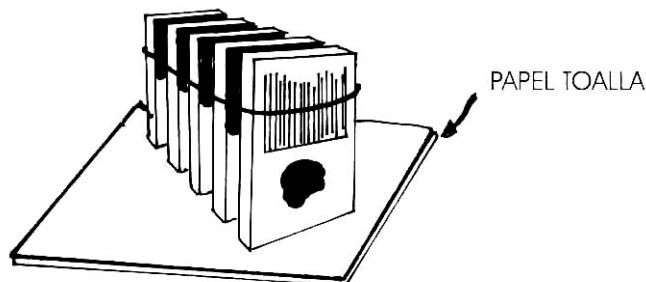
Introduzca nuevamente el bloque en el recipiente y asegúrese de que el colorante diluido cubra la gota gruesa de todas las láminas del bloque. Evite mojar los cartones, los frotices con el colorante. Deje actuar el colorante por 10 minutos.



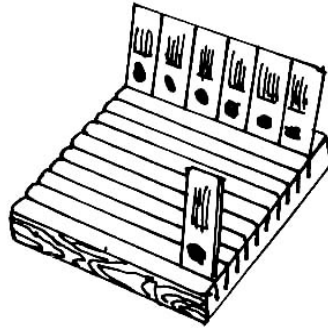
Saque el bloque del recipiente con colorante y enjuáguelo sumergiéndolo y sacándolo alternativamente a un recipiente con agua limpia, hasta que no se desprenda colorante en el enjuague. Evite mojar los cartones y los frotices.



Deje escurrir el agua del bloque, colóquelo sobre papel toalla o papel higiénico, y déjelo secar.



Cuando esté seco, retire las láminas del bloque, una por una, y colóquelas en la gradilla de madera, de modo que queden inclinadas y con la gota gruesa hacia abajo, evitando que la muestra toque algo.

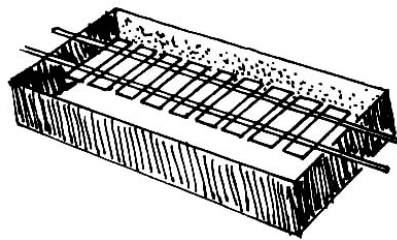


4.3 COLORACION DEL FROTIS:

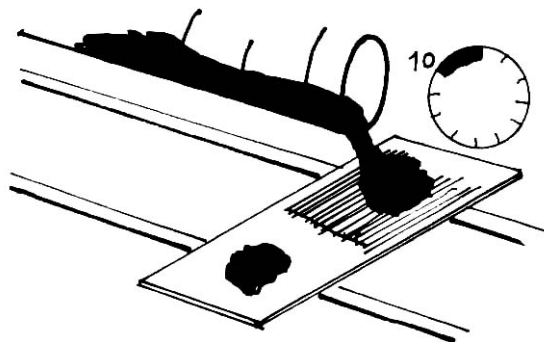
Si fuera necesario colorear el frotis de una o más de las láminas, hágalo siguiendo a las indicaciones dadas para la coloración en varilla de la gota gruesa. Fijar el frotis previamente con metanol.

4.3.1 Procedimiento:

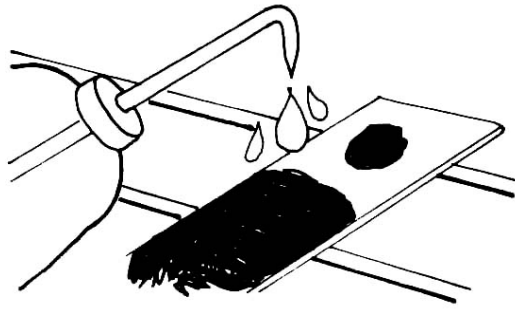
Coloque la varilla de vidrio sobre un lavatorio o recipiente, de tal forma, que facilite la eliminación de los líquidos que se usarán en la coloración. Coloque las láminas que debe colorear sobre la varilla, espaciándolas de modo que pueda manipularlas con seguridad.



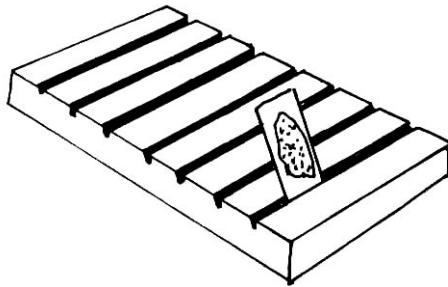
Vierta colorante diluido sobre el frotis, cubriéndola completamente. Haga esto, suavemente, y desde una distancia corta de la lámina. Deje actuar el colorante por 10 minutos. La experiencia le puede indicar la necesidad de modificar este tiempo de espera.



Descarte el exceso de colorante diluido y lave la lámina con un chorro suave de agua corriente (por ejemplo, con una pisceta), hasta que el agua no desprenda colorante.



Coloque las láminas en una gradilla de madera, de modo que queden inclinadas y con la gota gruesa hacia abajo, evitando que la muestra toque algo. Deje secar las láminas en esta posición.



CAPITULO V

OBSERVACION MICROSCOPICA

5.1 RECOMENDACIONES

Se necesita un **microscopio compuesto** con fuente de luz propia o con espejo para recibir luz natural o artificial. Si se usa como fuente externa de luz, una bombilla incandescente, la luz se debe hacer pasar por un filtro azul (que se puede preparar con la “solución azul cielo”), lo que permite visualizar más fácilmente al parásito.

Es importante, que conozca su microscopio, su manejo y limitaciones; y las reglas para mantenerlo en buen estado.

5.2 RECONOCIMIENTO DE LOS PLASMODIA

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

La identificación de la especie y del estadio se basa, principalmente, en el aspecto del núcleo y el del citoplasma del parásito.

El núcleo del parásito (la cromatina), es generalmente, redonda y se colorea de un rojo intenso (rojo grosella).

El citoplasma toma diferentes formas, desde una forma de anillo a una totalmente irregular, y se colorea siempre de azul, aunque la tonalidad puede variar ligeramente.

5.3 ASPECTO DEL PARASITO DE MALARIA EN SUS DIFERENTES ESTADIOS

En las tablas 1, 2 y 3 se presentan las características de los diferentes estadios de *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*; como se observan en la gota gruesa y en el frotís. (**Ver Figuras 1, 2 y 3**)

Para el reconocimiento de la especie y del estadio de los plasmodios, el frotís, permite observar mejor las características del parásito.

5.3.1 Etapa de Trofozoíto Joven

Esta etapa es la más vista; frecuentemente llamado anillo, aunque puede tomar la forma de un anillo incompleto. (**Ver Fotos 2, 3, 4 y 10**).

5.3.2 Etapa de Trofozoito Mediano y Adulto

Debido a que la etapa de trofozoíto. es una etapa creciente, el parásito dentro del glóbulo rojo puede variar en tamaño desde pequeño a grande. El pigmento malárico aparece a medida que el parásito crece. El pigmento es un subproducto del metabolismo del parásito que no se colorea, pero tiene un color propio, que puede variar de amarillo pálido a castaño oscuro o negro. (**Ver Fotos 5 y 7**).

5.3.3 Etapa de Esquizonte

En la etapa de esquizonte el parásito de malaria comienza a reproducirse. Esta reproducción es conocida como asexual debido a que el parásito no es hembra ni macho se reproducen solos por simple división, de parásitos con dos piezas de cromatina a parásitos con un número de puntos de cromatina y citoplasma definido. Cuando este estadio está presente el número de puntos de cromatina observados son de utilidad para determinar especies. (**Ver Fotos 6, 8 y 9**).

El proceso de formación de esquizontes, que tiene lugar en el hígado y en sangre, es conocido como esquizogonia (hepática o eritrocítica).

5.3.4 Etapa de Gametocito

La etapa de gametocito en los parásitos es sexual, se hace hembra o macho en preparación para la siguiente etapa, que tiene lugar en el estómago del mosquito anofelino hembra.

Los gametocitos pueden ser redondos o en forma de plátano o salchicha, dependiendo de la especie. (**Ver Fotos 1 y 3**).

5.4 APARIENCIA DE ESPECIES DE PARASITO EN FROTIS DE SANGRE

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

Una simple manera de distinguir entre los cuatro especies de malaria es el efecto que tiene el parásito dentro del glóbulo rojo infectado. Los caracteres distintivos son: el tamaño del glóbulo rojo (si está o no agrandado) si se ha coloreado o no las granulaciones de Schuffner dentro de la célula. (Ver Tabla 1).

Una vez que considere que es capaz de identificar con seguridad las etapas de crecimientos y las especies de parásitos de malaria en frotís, usted puede estar preparado para examinar en gota gruesa.

5.5 APARIENCIA DE LOS PARASITOS EN GOTA GRUESA

La apariencia de los glóbulos rojos y leucocitos cambian en el frotís y la gota gruesa, también hay diferencia en la apariencia de los parásitos de malaria en ambos casos.

La primera diferencia es obvia, usted observa una gota gruesa con el objetivo de inmersión 100X y ocular de 7X; y no aparecen glóbulos rojos. Sin embargo, los parásitos de malaria pueden ser vistos semejantes a los glóbulos blancos, pero tienen apariencia más pequeña que en el frotís. Necesita mirar muy cuidadosamente antes de identificarlos, enfocando y usando el tornillo de ajuste micrométrico, cada vez, que mueva un campo microscópico: esto le permitirá examinar la gota gruesa en profundidad.

El citoplasma de los anillos finos de los trofozoítos pueden aparecer incompletos o rotos. Esta apariencia es normal en muestras de sangre de gota gruesa.

Similarmente, la ausencia de glóbulos rojos puede dificultar la visión de las granulaciones de Schuffner; por tanto, en partes de la muestra no puede ser posible ver el punteado, el observar el parásito en diferentes etapas de desarrollo le ayudará para hacer el diagnóstico. (Ver Tabla 3).

Debe recordarse que las granulaciones de Maurer de *Plasmodium falciparum* no pueden ser vistos en gota gruesa.

5.6 ELEMENTOS QUE PUEDEN CONFUNDIRSE CON PARASITOS EN LAS MUESTRAS DE SANGRE

En las preparaciones sanguíneas las siguientes estructuras pueden confundirse con parásitos de la malaria.

- Plaquetas adheridas a los eritrocitos en las extensiones sanguíneas.
- Conglomerados de plaquetas.
- Fragmentos de leucocitos en las preparaciones de gota gruesa.
- Colorante precipitado.
- Restos de piel del paciente, polvo, bacterias, levaduras, esporas y otros microorganismos que caen en la preparación (si no se tienen protegidos), mientras se está secando.

- Algas y otros organismos que pueden estar contaminando el colorante.

Se deben recordar las tres características indispensables del plasmodio, presentes, tanto en la gota gruesa como en el frotis:

- Citoplasma azul violáceo o azul cielo.
- Núcleo rojo intenso o rojo grosella.
- Pigmento amarillo pálido o castaño oscuro o negro (depende de la especie).

5.7 EXAMEN DE RUTINA DE LA GOTA GRUESA Y DEL FROTIS

El examen de la gota gruesa es mejor para detectar la presencia de parásitos, mientras el examen del frotis es mejor para determinar la especie.

Rutinariamente, la gota gruesa debe ser examinada primero. Si está bien preparada y fue coloreada antes de su autofijación, es posible determinar las especies de los parásitos de malaria con este examen.

5.7.1 Examen de la gota gruesa

El examen de rutina de la gota gruesa requiere observar 100 campos óptimos.

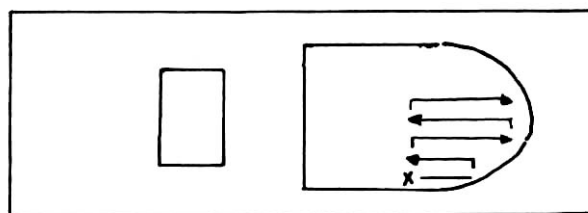
Una lámina puede declararse como negativa sólo después de observar los 100 campos sin haber encontrado parásitos.

Si se encuentra parásitos, igualmente, debe examinarse un total de 100 campos microscópicos. Esto asegura detectar una pequeña posibilidad de infección mixta (más de una especie presente en una muestra de sangre). Si es posible, debe identificarse la(s) especie(s) a la que pertenece(n) el parásito(s).

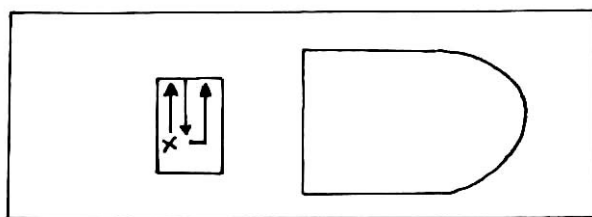
Use un contador manual para ayudarse en el conteo de los campos examinados. Uselo también en el recuento de parásitos.

5.7.1.a Procedimiento:

- Verifique la clave de la lámina que va examinar en la hoja de Registro de Datos.
- Coloque la lámina entre los soportes de la platina mecánica y verifique que esté sostenida, firmemente, al momento de mover el carro. De lo contrario, se puede perder de vista objetos sospechosos antes de que puedan ser ubicados.
- Examine la gota gruesa completa con el objetivo de 10X hasta localizar una zona conveniente para la búsqueda de plasmodios (una en la que se observen leucocitos numerosos y bien coloreados).
- Coloque aceite de inmersión sobre la zona seleccionada de la gota gruesa y haga girar el objetivo de 100X hasta ponerlo en posición sobre ella.
- Baje el objetivo hasta ponerlo en contacto con el aceite de inmersión.
- Verifique que la parte seleccionada de la lámina es aceptable.
- Examine 100 campos. Desplace la muestra de sangre siguiendo el patrón mostrado. Recuerde usar el ajuste fino para enfocar, y accionando el micrométrico hacia adelante y atrás con el fin de observar el mayor número posible de capas sanguíneas.



**Examen
en frotis**



**Examen
en gota
gruesa**

- Anote el número de parásitos observado y, si le fue posible hacer la identificación, a qué especie correspondieron.

5.7.2 Examen del frotís de sangre

El examen de frotís de sangre requiere mayor tiempo de observación en comparación con la gota gruesa.

Se debe realizar este examen en las siguientes circunstancias:

- Cuando no es posible examinar la gota gruesa por alguna razón (por ejemplo, ser muy pequeña).
- Cuando no es posible identificar en la gota gruesa la(s) especie(s) de *Plasmodium* presente(s).

El aspecto que deben presentar estas preparaciones al microscopio debe ser la siguiente:

- El fondo debe estar limpio y exento de residuos; los eritrocitos deben estar teñidos de color rosa-pálido.
- Los leucocitos tienen núcleo de color morado oscuro y gránulos bien definidos.
- Los gránulos de Schuffner deben verse como un moteado en los eritrocitos que contienen *P. vivax*.
- La cromatina de los *Plasmodia* se tiñe de color grosella intenso y el citoplasma de color azul violáceo o azul cielo. Los gránulos de Schuffner deben verse como un moteado en los eritrocitos.

5.7.2.1 Procedimiento:

- Coloque la lámina sobre la platina mecánica, entre los soportes de esta.
- Enfoque con el objetivo de 10X el extremo menos espeso del frotís, donde los glóbulos rojos están dispuestos en una sola capa.
- Coloque una gota de aceite de inmersión sobre la zona del frotís.
- Baje el objetivo de inmersión hasta poner en contacto con el aceite de inmersión y enfoque.
- Examine la película de sangre siguiendo el movimiento que muestra el modelo en el diagrama.
- Continúe examinando por aproximadamente 100 campos para determinar si la muestra de sangre es positiva o negativa para Malaria. Si el diagnóstico es dudoso deberá examinarse a lo menos 400 campos microscópicos.

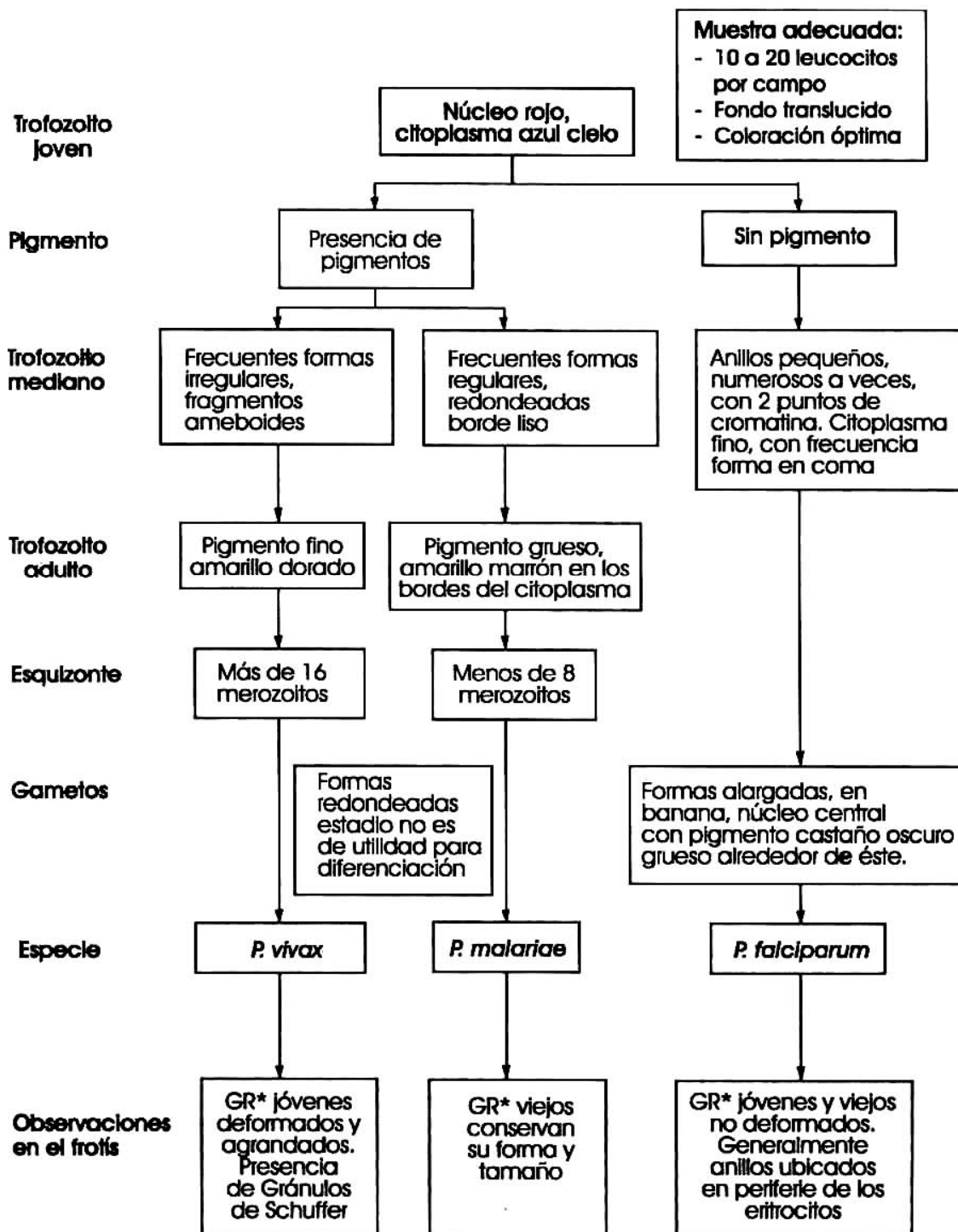
TABLA 1:
CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES ENTRE PLASMODIOS
VISTOS AL FROTÍS DE SANGRE HUMANA

Característica	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malarie</i>
Glóbulo rojo aspecto general	Tamaño aumentado Gránulos de Schuffner presentes	Tamaño normal	Tamaño normal o menor que lo normal
Trofozoíto joven (anillos)	Pequeño a grande. Un anillo por eritrocito generalmente. La infección múltiple es rara.	Pequeño y delicado, a menudo dos puntos de cromatina y generalmente dos o más anillos por eritrocito.	Casi compacto. Generalmente uno a dos anillos por eritrocito.
Trofozoíto mediano	Grande, ameboide. Pigmento en forma de bastones finos	Raro en sangre periférica. Si lo hay, es de tamaño moderado. Pigmento en gránulos.	Pequeño, compacto. A menudo en forma de banda. Pigmento granulado.
Trofozoíto maduro o adulto	Tamaño mediano, con citoplasma compacto. Pigmento fino.	Raro en sangre periférica.	
Esquizonte	Grande, con numerosos merozoítos (12 - 24), promedio 16 Pigmento concentrado en 1 ó 2 masas.	Mediano, con numerosos merozoítos (12 a 32). Pigmento en una masa única. Raro en sangre periférica.	Pequeño, pocos merozoítos grandes (6 a 12), promedio: 8 dispuestos en rosetas. Pigmento granuloso ubicado generalmente en la parte central.
Gametocitos	Esféricos, compactos. Núcleo único. Pigmento difuso y fino.	Forma de banana o salchicha. Núcleo único central.	Parecido al de <i>P. vivax</i> , pero más pequeño y menos numeroso en el frotis.

Sin embargo, ocasionalmente, usted puede encontrar dificultades para establecer la diferencia entre los trofozoítos maduros y los gametocitos de Plasmodium vivax y entre los trofozoítos maduros de Plasmodium malariae y los gametocitos redondeados de Plasmodium falciparum. Tampoco, es posible distinguir entre trofozoítos en estadios avanzado y los gametocitos de Plasmodium malariae en muestras de gota gruesa, pero si están presentes los gametocitos de Plasmodium falciparum es relativamente fácil hacer el diagnóstico.

TABLA 2:

ALGORITMO PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE MALARIA EN GOTA GRUESA



GR* = Hematíes

TABLA 3:

ASPECTO DE LAS DIFERENTES ESPECIES Y ESTADÍOS DE LOS PLASMODIA EN LA GOTA GRUESA

Estadio/ característica Trofozoito	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. malarie</i>
Tamaño	pequeño a grande	pequeño a mediano	pequeño a grande
Número	moderado	por lo general abundante	escaso a moderado
Citoplasma	fragmentado, de forma irregular	uniforme, fino	regular, denso
Cromatina	única, a veces, dos	a menudo dos núcleos	única grande
Formas	jóvenes (anillos, comas, sin pigmento) mediano (citoplasma amebosoide, fragmentado, con pigmento) maduro o adulto (compacto)	frecuentemente anulares y comas, las formas maduras (compactas) sólo presentes en casos graves	jóvenes (anulares) adultos (redondos, compactos)
Pigmento	fino, desperdigado	pocos gránulos o en masa única	abundante, generalmente rodeando el citoplasma
Esquizonte			
Tamaño	grande	pequeño, compacto	pequeño
Nº en sangre	escaso a moderado	poco frecuente, sólo en formas graves	escaso
Nº de merozoitos	12 a 24, generalmente 16	12 a 30, ó más	6 a 12, generalmente 8
Forma	en conglomerado irregular formas maduras	aglomerados y compactos	merozoitos en conglomerado laxo, de forma madura, algunos aparentemente sin citoplasma
Pigmento	dispuesto en masa suelta	masa única y oscura	concentrado
Gametocito			
Formas inmaduras	difíciles de distinguir de trofozoitos maduros	inmaduras: puntiagudas	difíciles de distinguir de trofozoitos maduros
Formas maduras	redondas, grandes	en forma de banana o redondeadas	redondeadas, compactas, algunas veces también difícil de distinguir de los trofozoitos maduros
Cromatina	grande y única, bien definida	única, bien definida	única, bien definida
Pigmento	desperdigado fino	desperdigado, grueso	desperdigado, rugoso, puede estar distribuido en la periferie
Formas erosionadas	con citoplasma oscuro o ausente, y sólo con cromatina y pigmento	a veces se observa órgano de extrusión de color rosa	sólo con cromatina y pigmento

Plasmodium falciparum

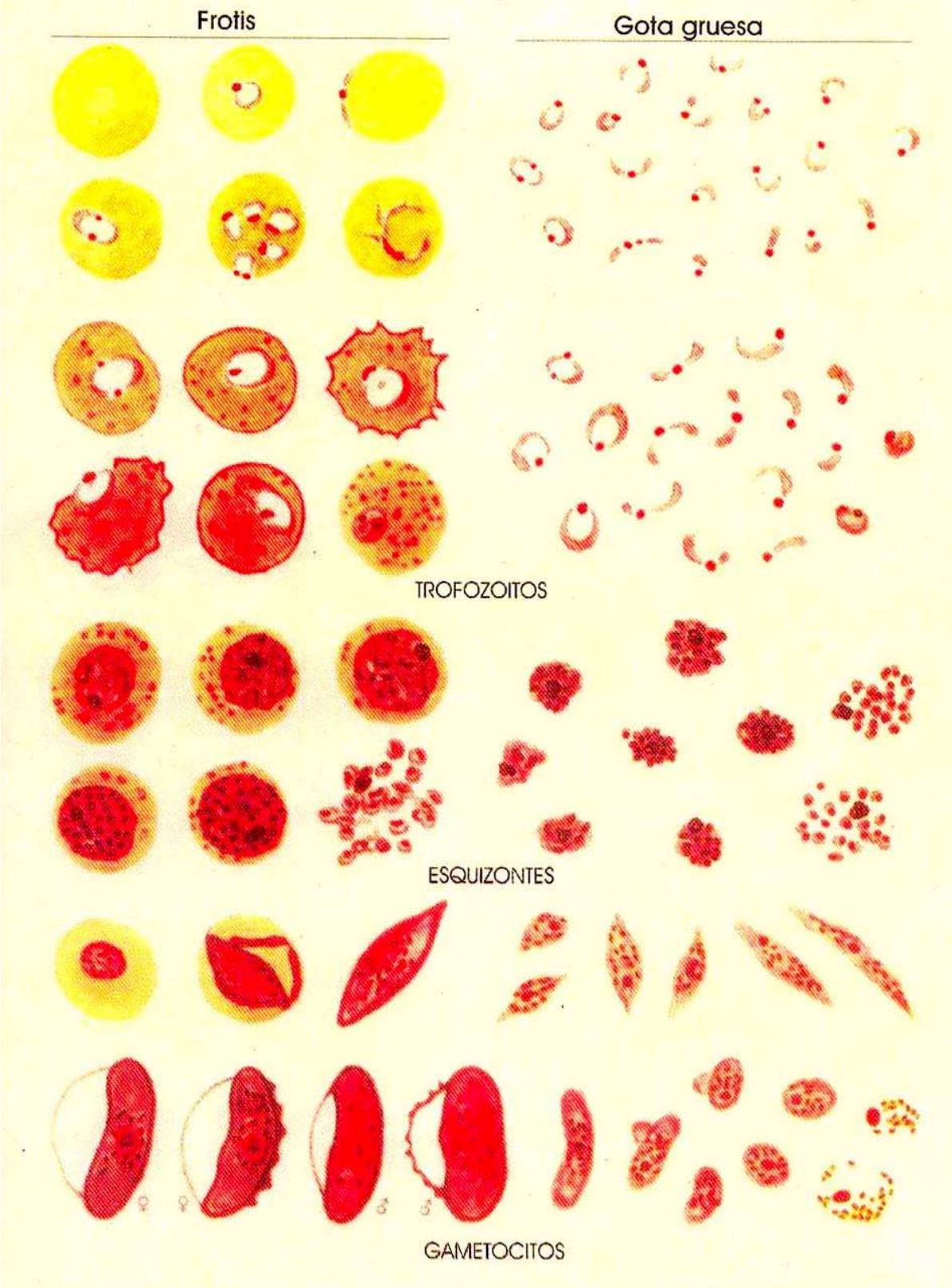


Figura 1: *Plasmodium falciparum*

Plasmodium vivax

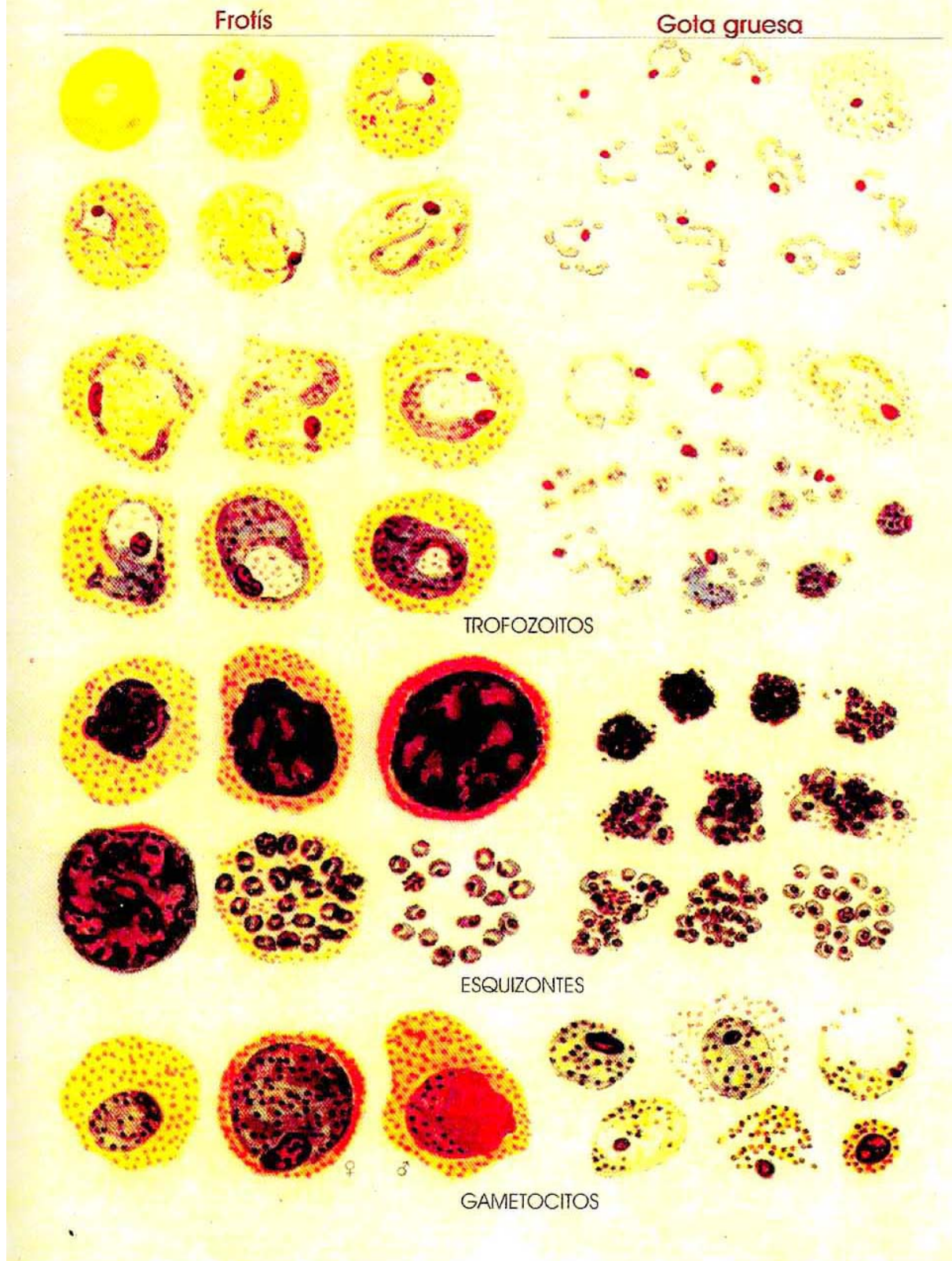


Figura 2: *Plasmodium vivax*

Plasmodium malariae

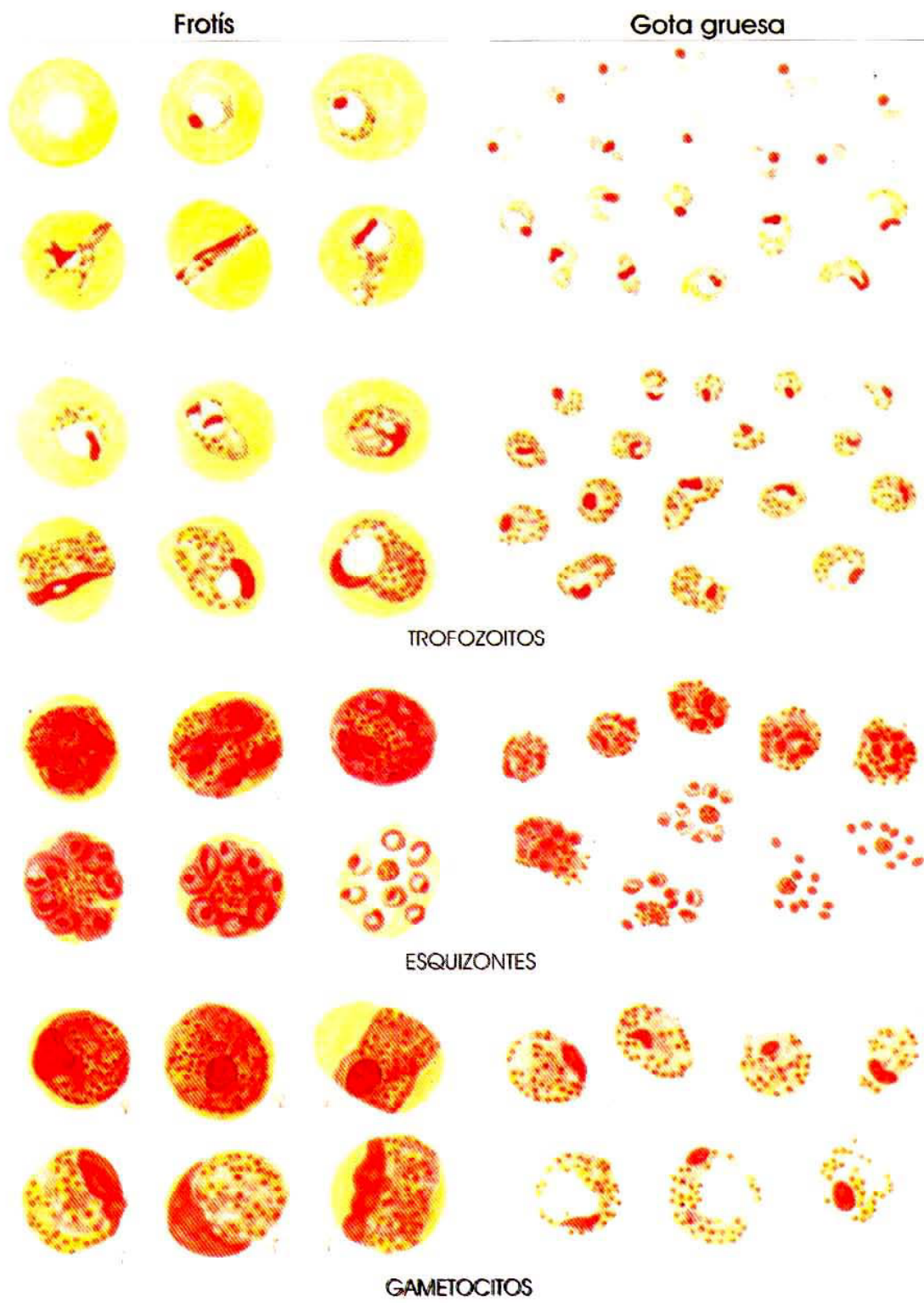


Figura 3: *Plasmodium malarie*

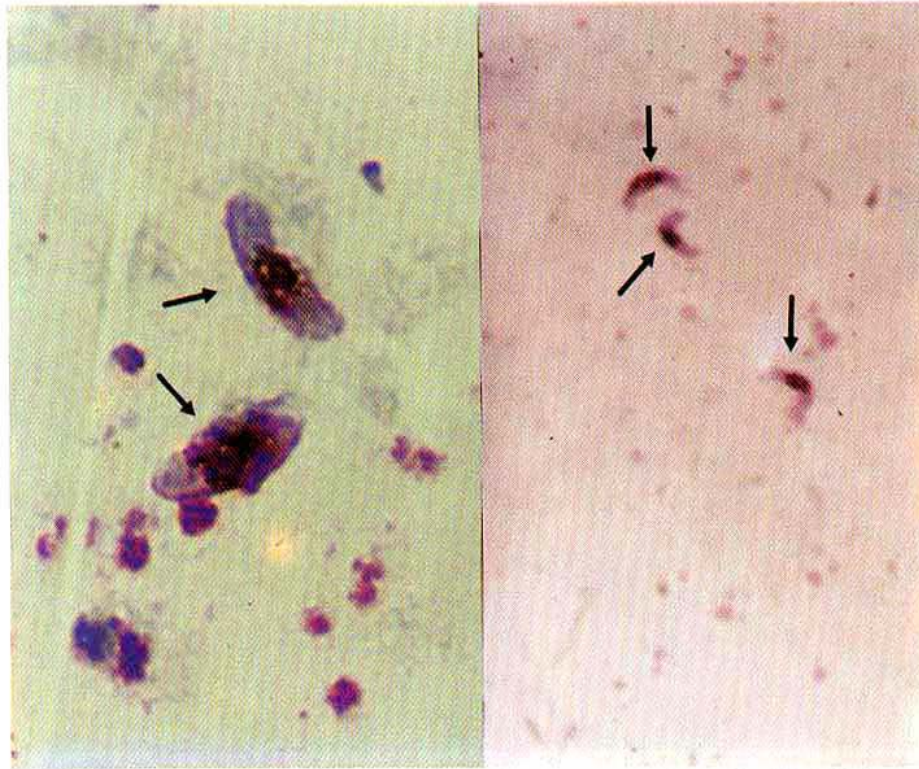


Foto 1: Observación microscópica de gametocitos de *P. falciparum* en gota gruesa. Coloración Giemsa 1,200X (izq., filtro verde), 1,000X (derecha).

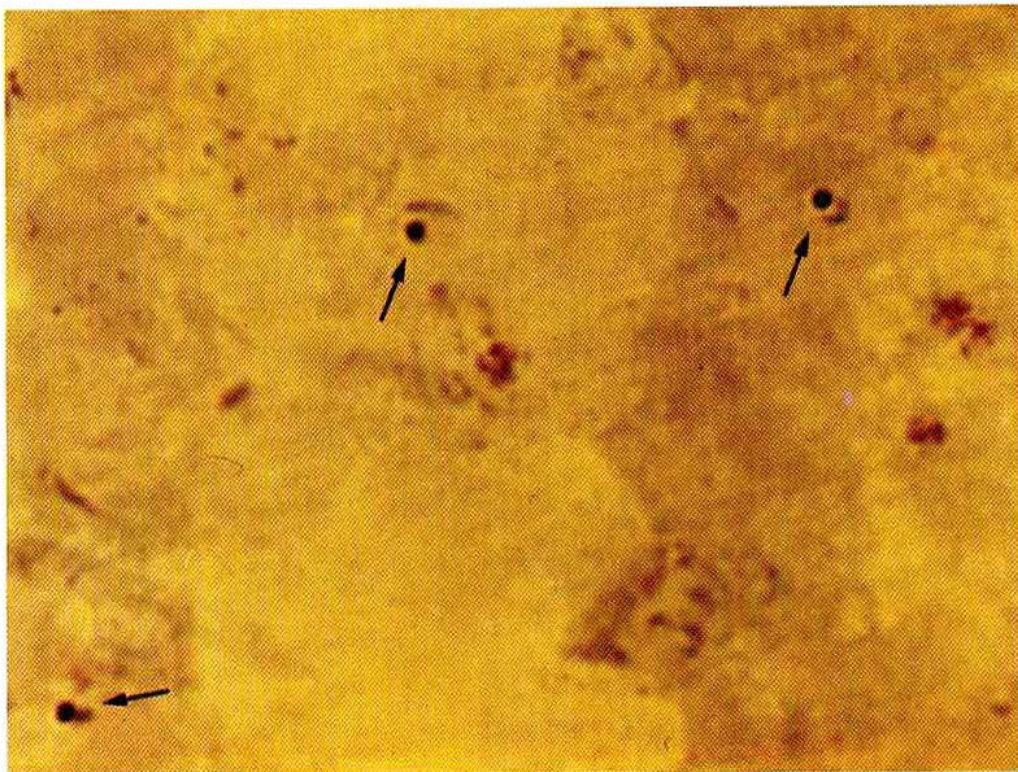


Foto 2: Observación microscópica de anillos de *P. falciparum* en gota gruesa. Coloración Giemsa 1,000X (foto tomada con filtro amarillo).

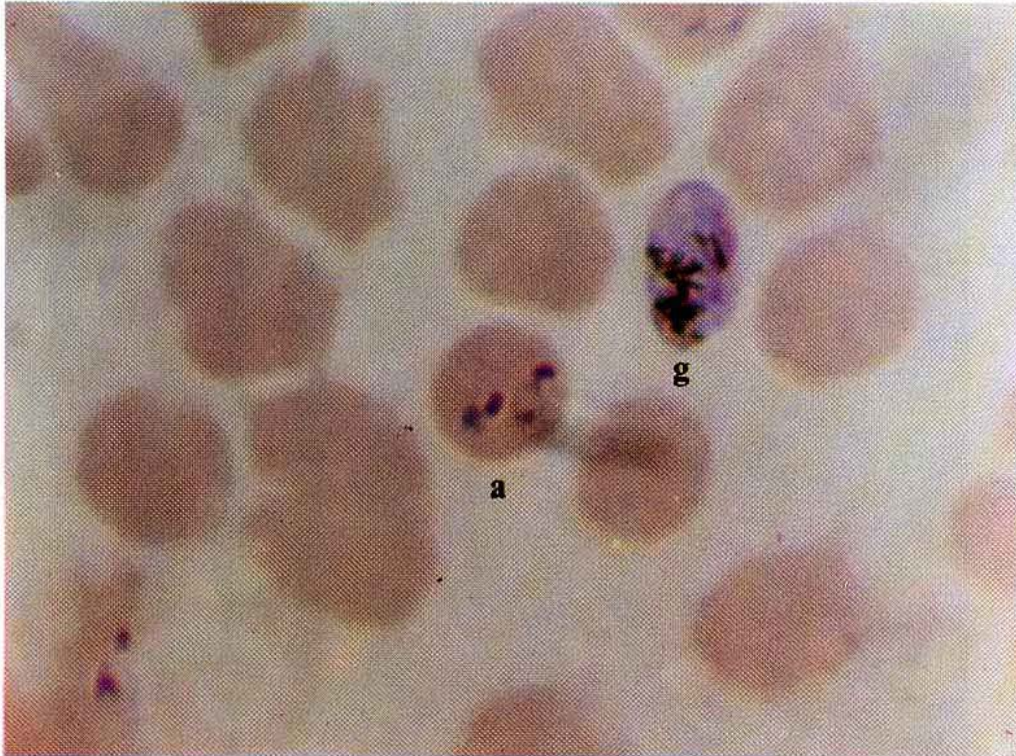


Foto 3: Observación microscópica de gametocito (g) y Trofozoítos jóvenes o anillos (a) de *P. falciparum* en frotís. Coloración Giemsa 1,000X

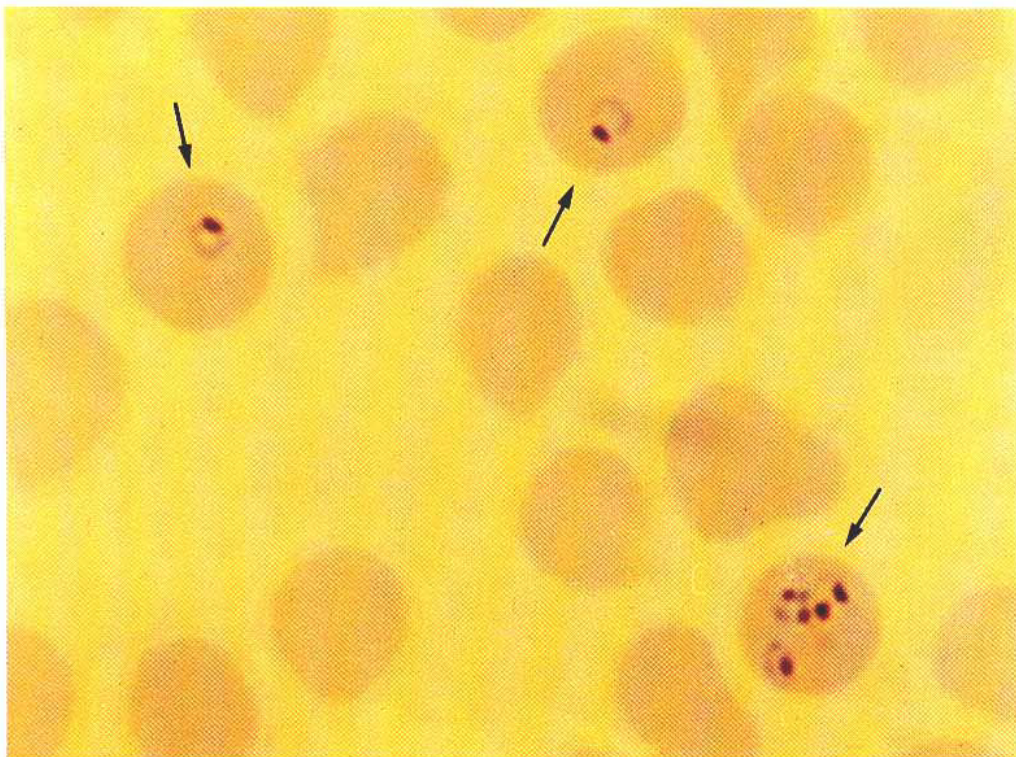


Foto 4: Observación microscópica de anillos de *P. falciparum* en frotís. Coloración Giemsa 1,000X (foto tomada con filtro amarillo)

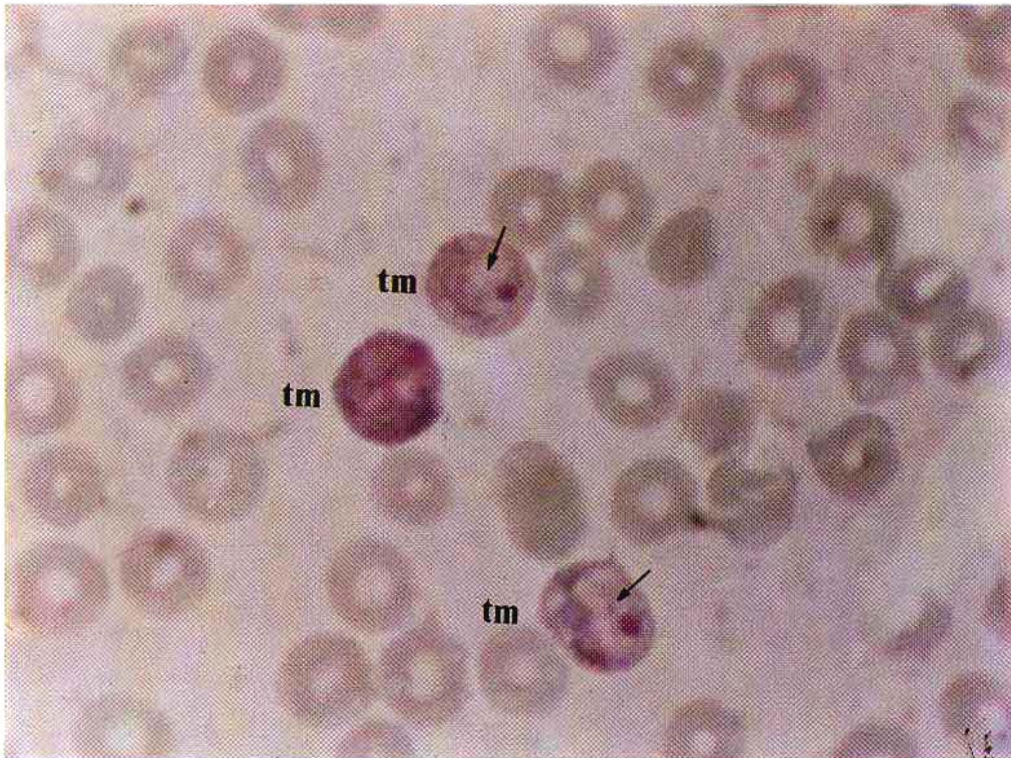


Foto 5: Observación microscópica de Trofozoitos medianos (tm) de *P. Vivax* en frotís. Se observan las granulaciones de Schüffner (flechas). Coloración Giemsa 1,000X

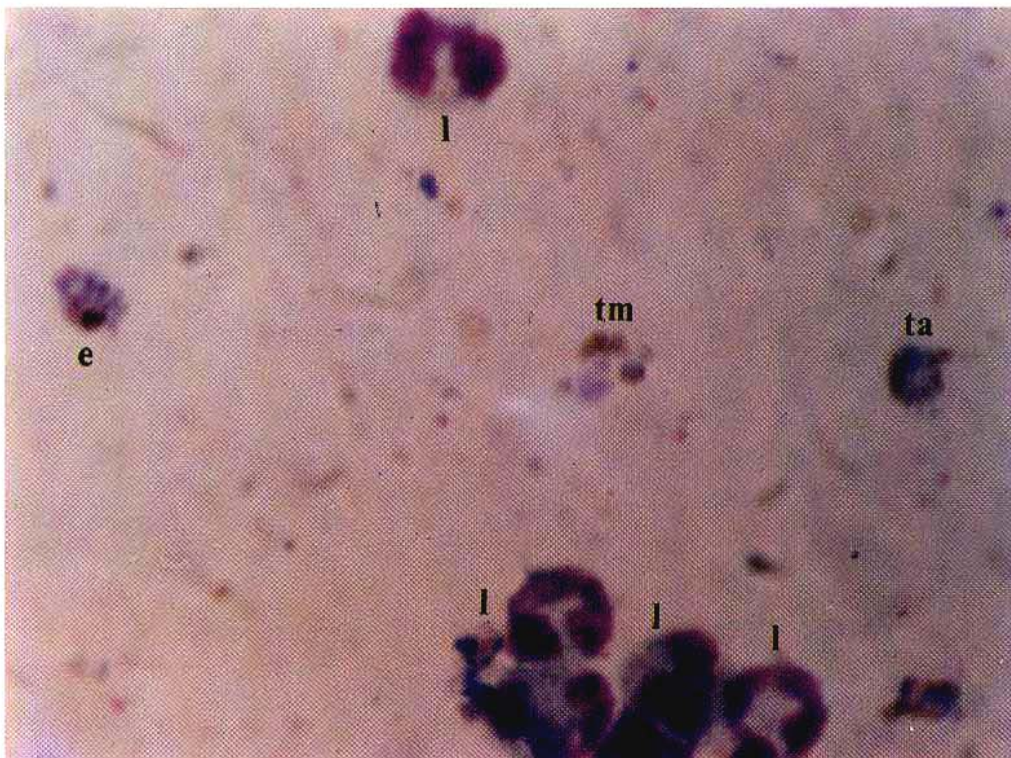


Foto 6: Observación microscópica de esquizonte (izquierda), Trofozoitos medianos (centro) y Trofozoitos adultos (derecha) de *P. Vivax* en gota gruesa. Se observan varios leucocitos (l). Coloración Giemsa 1,000X



Foto 7: Observación microscópica de Trofozoito adulto (ta) de *P. Malariae* en gota gruesa. En el extremo superior izquierdo se observa un leucocito (l). Coloración Giemsa 1,000X

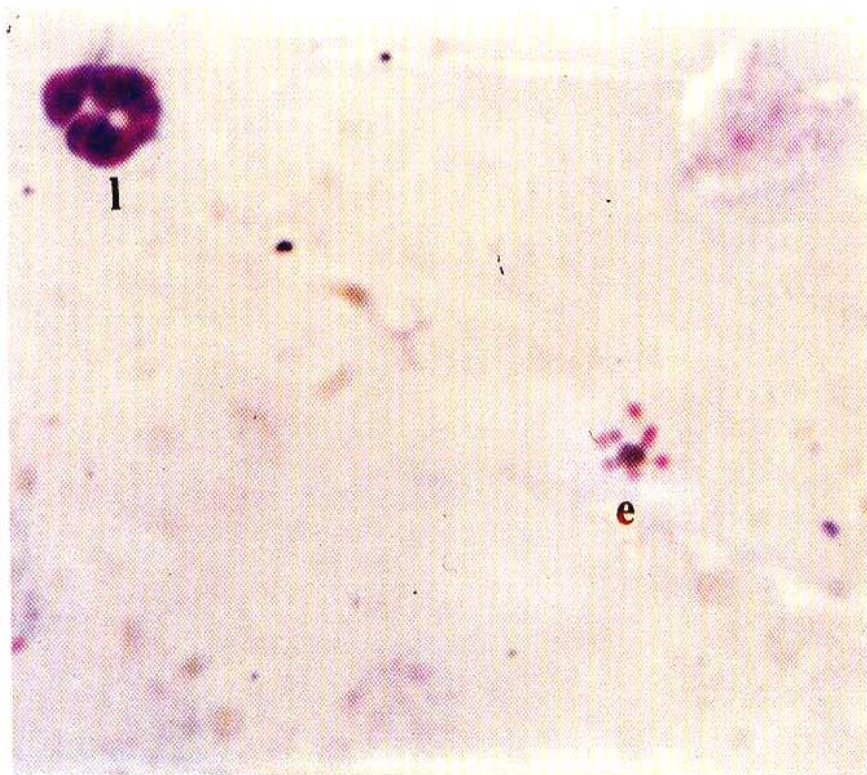


Foto 8: Observación microscópica en esquizontes de *P. Malariae* en gota gruesa. Coloración Giemsa 1,000X

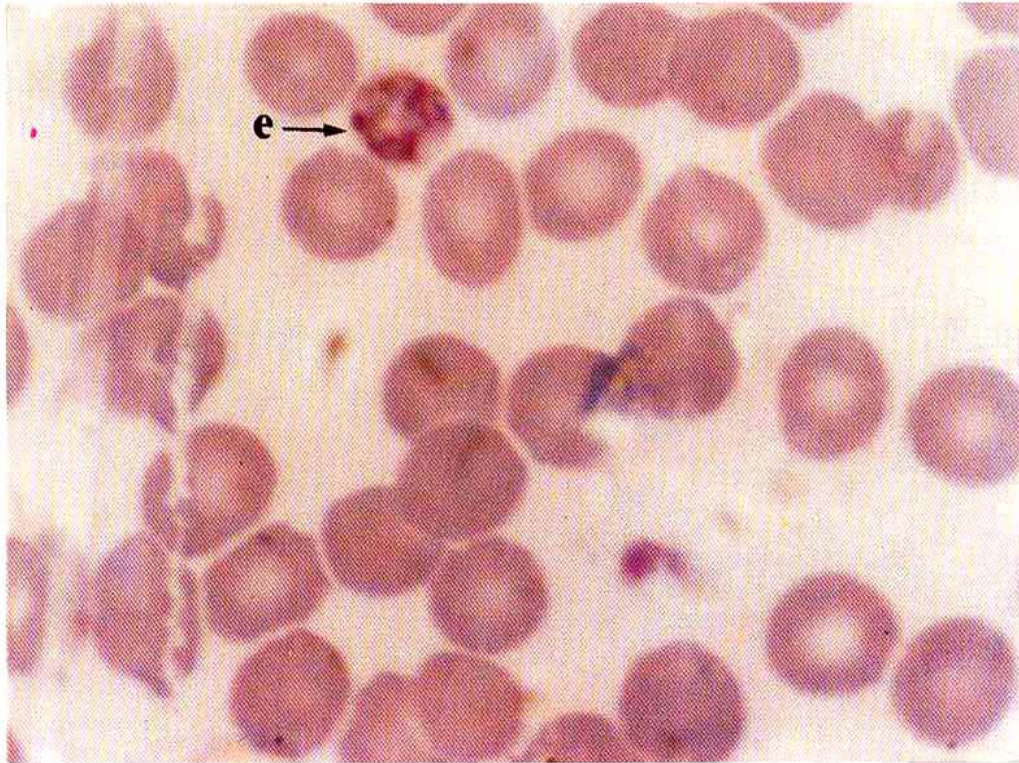


Foto 9: Observación microscópica en esquizonte inmaduro (e) de *P. Malariae* en frotis. Coloración Giemsa 1,000X

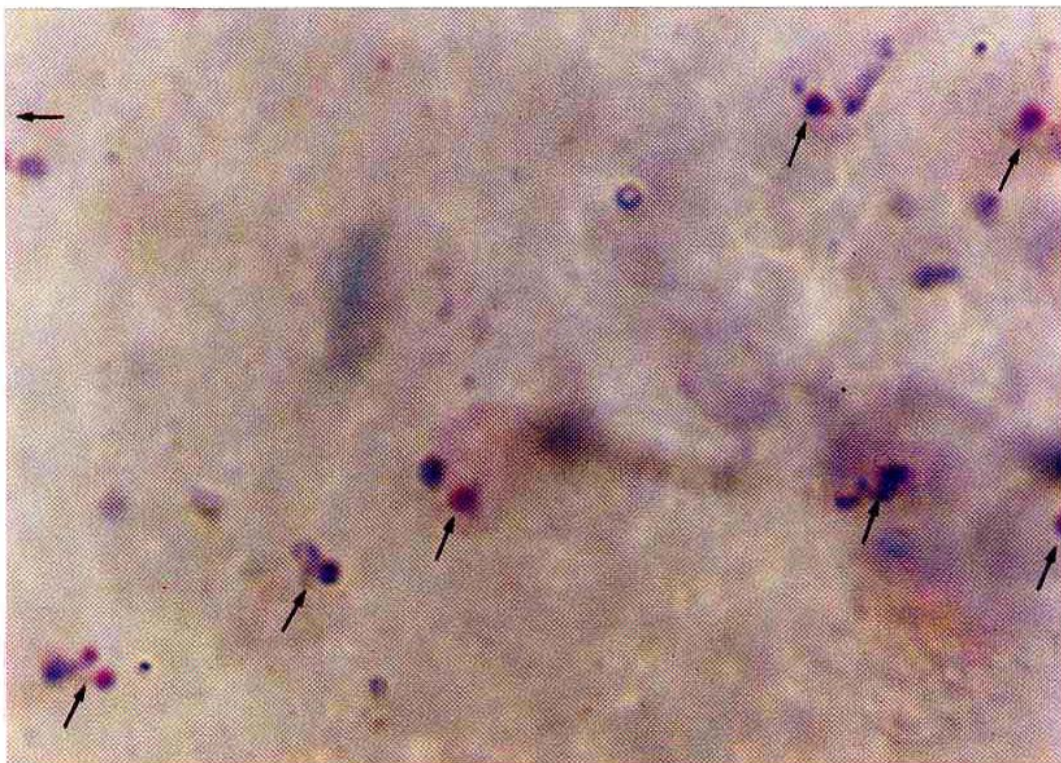


Foto 10: Observación microscópica de una preparación de gota gruesa mal deshemoglobinizada. Se observan parásitos (trofozoitos de *P. Vivax*) dentro de glóbulos rojos. Coloración Giemsa 1,000X

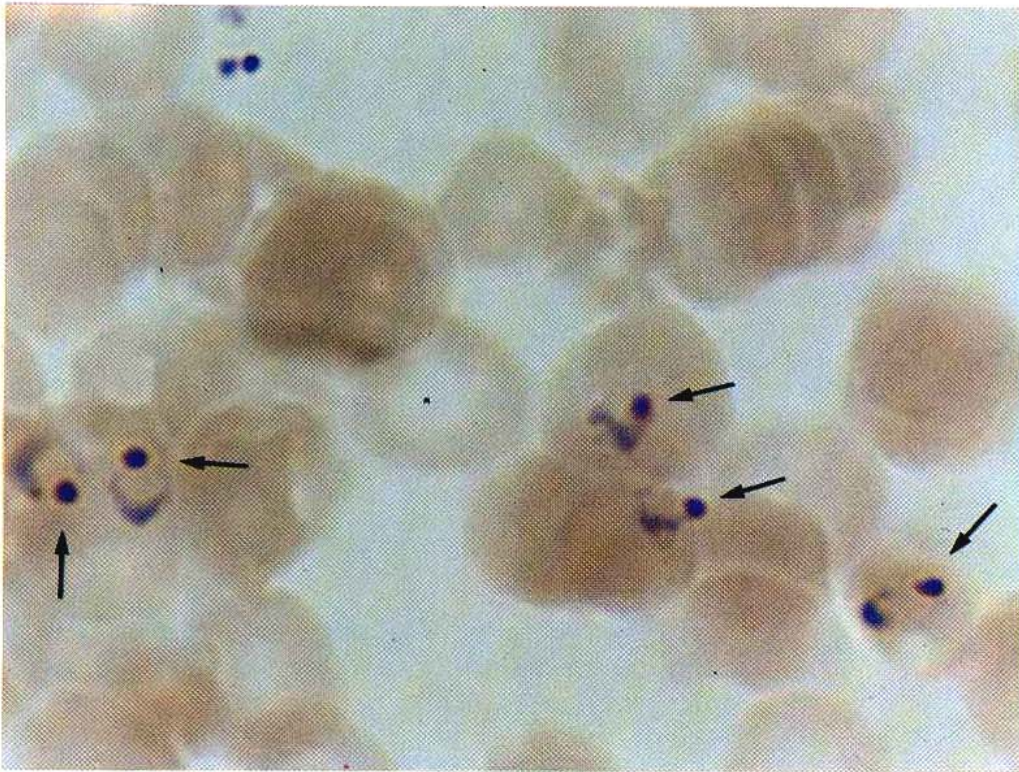


Foto 11: Trofozoitos jóvenes de *Plasmodium vivax* en frotis. Coloración Giemsa 1000X.

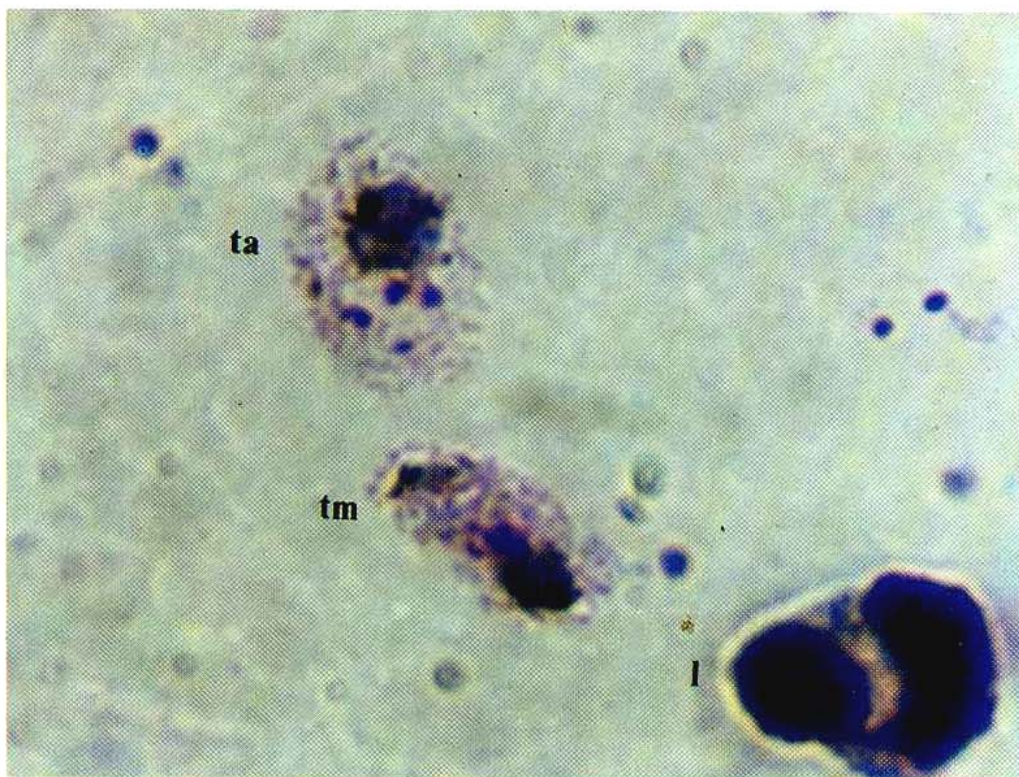


Foto 12: Trofozoitos medianos (tm) y adulto (ta) de de *P. Vivax* con granulación de Schüffner en lámina de gota gruesa mal deshemoglobinizada. Coloración Giemsa 1,000X

CAPITULO VI

DETERMINACION DE LA DENSIDAD PARASITARIA

6.1 CONSIDERACIONES GENERALES

La determinación de la densidad parasitaria es útil para:

- Evaluar la severidad de la infección malárica.
- Evaluar la eficacia del tratamiento sobre los parásitos, monitorizando la densidad parasitaria durante el tratamiento (o, dicho de otra manera, la sensibilidad de la cepa de *Plasmodium* a la droga o conjunto de drogas usadas en el tratamiento). Si el tratamiento es eficaz, la densidad parasitaria en la sangre debe disminuir progresivamente.

La determinación de la densidad parasitaria, es especialmente, importante en las infecciones por *Plasmodium falciparum*, las cuales, se asocian a enfermedad más severa y potencialmente fatal, por lo que es necesario el seguimiento de la evolución parasitológica en respuesta al tratamiento instaurado.

6.2 METODOS DE DETERMINACION DE DENSIDAD PARASITARIA

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

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

Este es un sistema indirecto usado rutinariamente, simple y que permite determinar el número de parásitos presentes por microlitro de sangre.

6.2.1.1 Procedimiento:

- Sume el total de parásitos observados en los 100 campos.
- Informe el resultado de la manera descrita a continuación.

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

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

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

6.2.1.2 Cálculo aproximado del número de parásitos presentes por microlitro de sangre:

Con un aumento de 750X, 100 campos microscópicos de inmersión en aceite en una muestra de gota gruesa bien preparada corresponden aproximadamente a 0.2 ul de sangre. Por lo tanto, debe multiplicar el total de parásitos observados en los 100 campos por 5.

Densidad parasitaria (parásitos por microlitro) = Parásitos observados en 100 campos x 5.

Por ejemplo, si en una lámina se observó 100 parásitos (en los 100 campos) la densidad parasitaria es de aproximadamente 500 parásitos por uL.

6.2.2 Método 2: Cálculo del número de parásitos por microlitro de sangre

Este es un método práctico, razonable y de precisión aceptable. El número de parásitos por microlitro de sangre en gota gruesa es calculado tomando como referencia un número estándar de leucocitos (8000) por ml de sangre. Aunque hay variaciones en el número de leucocitos entre individuos sanos y grandes variaciones entre individuos enfermos, este número estándar permite comparaciones razonables, particularmente, cuando se compara densidades en muestras obtenidas sucesivamente del mismo paciente.

Se necesitan dos contadores: uno para contar los parásitos y otro para los leucocitos.

6.2.2.1 Procedimiento:

Alternativamente, lleve a cabo uno de los dos pasos siguientes:

- Si después de contar 200 leucocitos, 10 o más parásitos han sido identificados y contados, anotar los resultados en los formatos de registro en términos de número de parásitos por 200 leucocitos.
- Si después de contar 200 leucocitos, hay 9 o menos parásitos, continuar contando hasta llegar a 500 leucocitos, luego registrar el número de parásitos por 500 leucocitos.

En cada caso, el número relativo de parásitos al número de leucocitos contados puede ser convertido a parásitos por microlitro de sangre usando la siguiente fórmula:

$$\text{parásitos por microlitro} = \frac{\text{número de parásitos} \times 8000}{\text{número de leucocitos}}$$

Por ejemplo, si son contados 200 leucocitos y 50 parásitos a la vez. Al aplicar la fórmula se tendrá

$$\text{parásitos/uL} = \frac{50 \times 8000}{200} = 2,000 \text{ parásitos}$$

6.3 DETERMINACION DE LA DENSIDAD EN CASOS DE MALARIA POR *Plasmodium falciparum*

Es normal en la práctica, el conteo de todos los estadíos o fases presentes, y contar y anotar, separadamente, los gametocitos de *Plasmodium falciparum* y los estadíos asexuales.

Cuando la infección malárica es por *Plasmodium falciparum*, además de la densidad parasitaria se debe registrar el número de parásitos en cada fase de desarrollo de la siguiente manera:

F	=	Anillos únicamente
F y Fg	=	Anillos y gametos
Fg	=	Gametos únicamente

Cuando se detecta un caso positivo a *Plasmodium falciparum*, se debe reportar, inmediatamente al jefe inmediato y realizar un seguimiento o control de la eficacia del tratamiento. Se debe tomar muestras como mínimo durante 07 días consecutivos y, si se puede seguir observando el paciente por más tiempo, tomar 02 muestras semanales durante la 2da., 3ra. y 4ta. semanas.

En el seguimiento de un caso a *Plasmodium falciparum*, se debe observar como mínimo 300 campos microscópicos con la finalidad aumentar la probabilidad de detectar la ocurrencia de resistencia a la(s) droga(s) antimaláricas o de recrudescencia de la infección.

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

Clave Original

Claves de Seguimiento

(201) 15

(201) 15-1, (201) 15-2, (201) 15-3, etc.

Registrar los resultados en la ficha “Seguimiento específico *In vivo* de casos de malaria tratados” (Ver Anexo 8).

CAPITULO VII

CONTROL DE CALIDAD EN MICROSCOPIA DE MALARIA

7.1 CONSIDERACIONES GENERALES:

La supervisión es necesaria por las siguientes razones:

- Para confirmar si el trabajo que se está realizando está bien hecho, y si el personal ha sido entrenado para ello.
- Para facilitar y corregir errores en el procesamiento de las mismas.
- Para indicar la necesidad de readiestramiento.
- Para proveer de una buena oportunidad de conversar con el supervisor de alguna dificultad en el trabajo.

7.2 TIPOS DE SUPERVISION

Existen dos tipos de supervisión: Directa e Indirecta.

7.2.1 Supervisión directa (Anexo N° 6)

En la supervisión directa un supervisor llegará a su centro de trabajo y entrará en contacto con usted a través de una visita por un periodo de tiempo prolongado. El supervisor, observa su trabajo y ve como lo realiza, del mismo modo que analiza que dificultades tiene, además, tiene la oportunidad de discutir aspectos importantes de su trabajo y promover soluciones que podrían facilitar su labor. El procedimiento de las actividades de supervisión directa serán desarrolladas en el manual respectivo.

7.2.2 Supervisión indirecta

En la supervisión indirecta se conoce el trabajo del personal a través de las láminas enviadas periódicamente a un laboratorio de referencia (laboratorio intermedio) para la evaluación técnica de la muestra, coloración y repetibilidad en el resultado de diagnóstico, las que se conocen como Control de Calidad de Gota Gruesa.

7.3 PROCEDIMIENTOS TECNICOS PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE GOTA GRUESA

7.3.1 Envío de láminas del nivel local al intermedio

Todos los laboratorios de nivel local que realicen diagnóstico de malaria enviarán láminas para su revisión al laboratorio Intermedio de la siguiente manera:

7.3.1.a Personal recién capacitado para su evaluación enviar al Laboratorio Intermedio:

1er. Trimestre	100 % de positivas y 100% de negativas
2do. Trimestre	100 % de positivas y 50% de negativas
3er. Trimestre	100 % de positivas y 25% de negativas
4to. Trimestre	100% de positivas y 10% de negativas

7.3.1.b Personal con experiencia:

Enviará al Laboratorio Intermedio el 100% de positivas y el 10% de las negativas, separando los grupos de láminas positivas de las negativas, acompañada de su ficha correspondiente “Informe Mensual: Gota Gruesa” del Laboratorista.

- Se recomienda que al momento de enviar las láminas para su revisión, éstas deben estar limpias, eliminando todo residuo de aceite de inmersión.
- El embalaje se hará con cartón corrugado y asegurado con pabilo, a fin de evitar el deterioro o rotura de las mismas.
- Es aceptable, para su revisión, el envío de láminas hasta con un retraso de 4 semanas.

7.3.2 Calidad técnica de gota gruesa

7.3.2.b Calidad óptima de la coloración de la gota gruesa

Deshemoglobinización: fondo transparente.
 Calidad: 10 a 20 leucocitos por campo.
 Coloración del parásito: núcleo: rojo intenso o grosella.
 citoplasma: azul cielo o violáceo.
 pigmento: amarillo sin brillo.

En la **Foto 10** se muestra una lámina mal deshemoglobinizada.

7.3.2.c Calidad del diagnóstico : Repetibilidad. Se determinará revisando y confrontando el diagnóstico local:

- Se considera error de diagnóstico la lámina que siendo positiva o negativa en el nivel local, resulte negativa o positiva en el nivel intermedio. Ejemplo:

Diagnóstico Local	Rev. Int. R.M.	Error
Positivo	Negativo	N x P (Falso positivo)
Negativo	Positivo	P x N (Falso negativo)

- La observación microscópica de la revisión estará en relación directa con la calidad y coloración de la muestra, teniendo que observar como mínimo 100 campos microscópicos en una muestra bien preparada (10-20 leucocitos por campo). Si esto no se cumple, se empleará un Factor de corrección cuyo resultado nos indicará el número de campos microscópicos a observar antes de considerar el error de diagnóstico.

$$Fc = \frac{8,000}{x \text{ leucocitos en 10 campos}} \times 0.2$$

Fc = Factor de corrección
 x = Promedio

- Se considera error de especie cuando no presenta concordancia con el Diagnóstico Positivo de especie reportado por el Laboratorio Local.

7.3.3 Calidad técnica del frotis

7.3.3.a Calidad óptima de la muestra del frotis

Tamaño : 3 cm.
 Ubicación : del centro al borde externo.
 Adherencia : óptima
 Identificación : legible (Fecha y Número).

CAPITULO VIII

CULTIVO *in vitro* DE *Plasmodium falciparum*

Los Plasmodia pueden desarrollarse y ser mantenidos en el laboratorio en su ciclo asexual en cultivos continuos *in vitro*.

La técnica está orientada a la obtención de antígenos para estudios serológicos, sensibilidad de los Plasmodia a las drogas antimaláricas y para estudios de biología molecular. El mantenimiento y cultivo de Plasmodia se realiza en Medio RPMI 1640 suplementadas con HEPES y enriquecido con suero humano a una temperatura de 37°C (una atmósfera de 5% de dióxido de Carbono y 5% de oxígeno).

Los cultivos serán realizados según la técnica descrita por TRAGER & JENSEN (1976) modificado por (JENSEN & TRAGER 1977).

8.1 EQUIPOS:

- Una cabina de flujo laminar
- Una incubadora de CO₂
- Una refrigeradora 4°C
- Una congeladora -20°C
- Una congeladora -80°C
- Una centrífuga
- Un microscopio compuesto
- Un autoclave
- Un horno 30°C a 300°C para esterilizar
- Un Grid (aditivo de ocular para recuento de células)
- Dos contadores manuales para células

8.2 REACTIVOS:

- Medio RPM 11640
- HEPES
- Carbonato de Sodio hidrogenado (Na HCO₂)
- Gentamicina
- Glutamine N₂NCO (CH) (NH₂) COOH
- Agua bidestilada
- Cloruro de Sodio (NaCl)

8.3 MATERIALES: .

- Frascos para cultivo celular o placas petri.
- Pipetador mecánico.
- Filtros (0.22 micron filter) para botella con adaptador N° 33 de 250 y 500 mL.
- Botellas de vidrio graduadas de 250, 500 y 1000 mL.
- Beaker graduados de vidrio o polyacrilamida (de preferencia) de 100; 250; 500; 1,000; 2,000; 3,000 y 4,000 mL de capacidad.
- Láminas portaobjetos.
- Pipetas graduadas de vidrio de 25, 10, 5, 2, 1 mL.
- Pipetas Pasteur de vidrio.

8.4 PREPARACION DE MEDIO Y OTROS

8.4.1 RPMI 1640 (Medio incompleto = M -) 1 L.

- RPMI 1640 c/s glutamine 10.20 g.
- HEPES 5.95 g.
- Carbonato de sodio Na HCO 2.00 g.
- Agua bidestilada 950.00 mL.
- Gentamicina (10 mg/mL) 2.50 mL.
- Glutamine 0.30 g.
- Ajustar el pH a 7.36 con NaOH 1 N.
- Completar a 1 L teniendo en cuenta el volumen de Hidróxido de Sodio (NaOH) empleado para descontar al final.
- Esterilizar por filtración dentro de la cabina de flujo laminar.

8.4.2 ERITROCITOS HUMANOS DEL GRUPO “O” (Stock)

- Procedente de donantes.
- Colectar asepticamente con heparina, centrifugar a 2,200 r.p.m. y separar el plasma.
- Transferir en frascos de 200 mL, mezclar con igual Volumen de Medio y guardar a 4°C debidamente rotulado. Esto puede durar de 2-3 semanas en óptimas condiciones.

8.4.3 SUERO HUMANO GRUPO “O” o “AB”

- Colectar dentro de bolsas de sangre sin anticoagulante de donantes que no hayan tenido infección de malaria por *P. falciparum*.
- Mantener a temperatura ambiente por un período de 3 a 5 horas para retraer el coágulo.
- Centrifugar a 2,500 r.p.m. por 10 minutos.
- Recolectar en tubos para centrífuga de 50 mL en cantidades de 25 a 30 mL (es recomendable) y guardar a -20°C hasta el momento de usar.

8.4.4 RPM MEDIO COMPLETO (M +)

- Descongelar el suero.
- Añadir el suero al medio incompleto al 10%.
- Guardar en la refrigeradora.

8.4.5 LAVADO DE GLOBULOS ROJOS - PROCEDIMIENTO

- Desde el stock de glóbulos rojos (frasco de 200 mL).
- Tomar 25 mL y colocarlo en tubo de centrífuga de 50 mL.
- Centrifugar a 2200 r.p.m. por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante con una pipeta.
- Agregar medio incompleto, mezclar cuidadosamente, centrifugar a 2200 r.p.m. por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y repetir el paso anterior 2 veces más.
- Resuspender los glóbulos rojos con medio completo (M +) al 50% para evitar su deterioro.
- Guardar en la refrigeradora.

NOTA: Estos glóbulos rojos lavados puede ser usados una semana en óptimas condiciones. Por lo tanto, es importante rotular y poner fecha.

8.4.6 RECOMENDACIONES :

Todos los procedimientos deben realizarse dentro de la cabina de flujo laminar. Todos los frascos o placas deben ser previamente rotulados con el nombre y/o número de la muestra, la fecha de inoculación de los glóbulos rojos parasitados así como la lámina portaobjetos empleada para el recubierto parasitario

8.5 PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE PARASITOS DE PACIENTES INFECTADOS POR *Plasmodium falciparum*

- Extraer sangre venosa con una jeringa de 10 cc. conteniendo Heparina 200 UI o ACA: 1 mL por 10 mL

de sangre.

- Transferir la sangre en un tubo de 50 mL para centrifuga y centrifugar a 1,500 r.p.m. por 5 minutos.
- Separe el plasma y guarde en tubos para criopreservación a -70°C.
- Lave el sedimento con medio RPMI incompleto (M-) 3 veces, por centrifugación a 1500 r.p.m. por 5 minutos cada vez, remueva cuidadosamente los glóbulos blancos por aspiración con una pipeta.
- Resuspender los eritrocitos con medio completo para un hematocrito final de 5- 10% en una suspensión distribuida en placas petri de 35x10 mm (1.5 mL), 60x15 mm (4 mL) ó 100x15 mm (8 mL), o también en frascos para cultivo celular, incubar a 37°C en una atmósfera de 5% de Dioxido de Carbono y 5% de oxígeno, en estufa de CO₂. También se puede conseguir estas condiciones en un desecador a través de una vela.
- Cambie el medio cada 24 horas y hacer dos frotices del sedimento, fijar y teñir para evaluar el porcentaje de parasitemia (Ver Determinación del Porcentaje de Parasitemia en Frotís).
- Cuando la parasitemia llegue al 6% (u 8%), los cultivos serán diluidos con hematíes no infectados.
- Los porcentajes de parasitemias mayores al 8% son perjudiciales para el desenvolvimiento normal de los parásitos debido al acúmulo de ellos y a la producción de variaciones del pH del medio.

NOTA: Si la muestra es colectada en el campo, la jeringa puede guardarse dentro de una bolsa plástica sellada con hielo. Los parásitos no desarrollan a bajas temperaturas, es decir, no afectan las formas anulares.

8.6 CAMBIO DEL MEDIO DE CULTIVO

- Incline el frasco o placa suavemente y extraiga el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
- Del sedimento prepare 2 láminas con frotis para evaluar el porcentaje de parasitemia.
- Añada medio completo (a temperatura ambiente) el mismo volumen que extrajo dentro del frasco o placa, agite suavemente e incube.
- Fijar, colorear y observar las láminas bajo el microscopio y con objetivo de inmersión para evaluar la parasitemia.

8.7 CRIOPRESERVACION O CONGELAMIENTO :

Las cepas de *P. falciparum* serán congeladas con porcentaje de parasitemia 2-3 % y con predominio de formas anulares.

8.7.1 Reactivo: (Para 200 mL)

- | | |
|--|-----------|
| - Glicerol | 114.20 g. |
| - Solución de lactato de Sodio | 4.40 g. |
| - Cloruro de potasio (KCl) | 0.07 g. |
| - NaH ₂ PO ₄ y 2h ₂ O | 0.15 g. |
| - Agua bidestilada | 100 mL. |

* Mezclar bien.

* Ajustar el pH a 6.80 con hidroxido de sodio 1N.

* Ajustar el volumen a 200 mL.

* Esterilizar por filtración con un filtro de 0.22 micras.

8.7.2 Procedimiento :

- Centrifugue el material de cultivo a 1500 r.p.m. por 5 minutos.
- Descarte el sobrenadante y mide el volumen del sedimento.
- Añada 0.4 vol. (del sedimento) de la solución criopreservante gota a gota y mezcle cuidadosamente.
- Equilibre a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Agregue 1.2 volúmenes de la solución criopreservante gota a gota y mezcle cuidadosamente.
- Transferir con una pipeta en tubos para criopreservación rotulados correctamente con el código de la cepa o muestra, y la fecha de criopreservación.
- Guardar los tubos envueltos con algodón dentro de una caja o recipiente a -70°C (se conserva bien por 2 a 5 años).

8.7.3 Descongelamiento de las Cepas

- Estabilizar el baño María a 37°C, medir el volumen de muestra y colocar en un tubo de centrifuga de 15 mL.
- Añadir gota a gota, 0.92 mL de cloruro de sodio al 12% (por mL de muestra), mezclar suavemente y equilibrar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Agregar gota a gota, 6.2 mL de cloruro de sodio al 1.6% (por mL de muestra), del volumen y mezclar suavemente.
- Centrifugar a 1,500 r.p.m. por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante con una pipeta.
- Lavar con cloruro de sodio al 1.6%.
- Agregar medio completo, centrifugar a 1,500 r.p.m. por 5 minutos y descartar el sobrenadante, y resuspender los eritrocitos con medio completo para continuar el cultivo de los parásitos (Ver ítem 8.5).

8.8 DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE PARASITEMIA EN FROTIS SANGUINEO

Los frotís fijados y coloreados con Giemsa se examinan con objetivo de inmersión y empleando dos contadores de celulares manuales. La parasitemia se debe determinar contando el número de hematíes infectados en 1000 células como mínimo. Si la parasitemia es muy baja (menor de 5%), se contará de 5,000 a 10,000 células.

El número de campos a contar dependerá del número de hematíes por campo microscópico.

Ejemplo:

Células Contadas	Células Infectadas	Porcentaje
1,000	80.0 %	8 %
10,000	80.0 %	0.8 %

CAPITULO IX

SEROLOGIA DE MALARIA

El Inmunodiagnóstico de Malaria abarca métodos que evalúan la inmunidad humoral y la inmunidad celular del huésped. La Metodología es suficientemente sensible y específica para detectar la infecciones en las que la parasitemia es baja, para diferenciar infecciones pasadas de la actual, la primoinfección de las recrudescencias y las reinfecciones.

La metodología es útil en las zonas endémicas de malaria para: 1. medir el grado de la enfermedad 2. verificar la presencia o ausencia de infecciones maláricas 3. delimitar zonas maláricas 4. detectar cambios estacionales de transmisión 5. Evaluar las actividades antimaláricas y en las Zonas de malaria no endémicas son útiles para:

- a. Seleccionar donantes de sangre
- b. Elucidar casos clínicos indefinidos
- c. Evaluar la terapéutica
- d. Diagnóstico de casos febriles con Examen parasitológico negativo
- e. Detectar individuos con formas latentes de la enfermedad.

En este capítulo se describirán las Técnicas Serológicas :

- * Técnica Indirecta de Anticuerpos Fluorescentes (IFAT o IFI).
- * Ensayo Inmunoenzimático ELISA.

9.1 TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Esta prueba se considera de referencia en el serodiagnóstico y seroepidemiología de la malaria, sirve para detectar anticuerpos en los sueros, determinar los títulos de anticuerpos séricos y seguir el curso de producción. Este método refiere alta sensibilidad y especificidad, recomendada para Laboratorios Intermedios. Hay que tener en cuenta que la elección de un antígeno dependerá del objetivo, como fuente se puede utilizar sangre de personas que tienen una infección primaria activa o de cultivo continuo "*In Vitro*". (Ver Capítulo VIII de este manual).

Para el logro de una prueba óptima, hay que tener en cuenta:

- La fuente del antígeno (proporción de esquizontes).
- Preparación y conservación de antígenos en láminas.
- Diluyente de los sueros.
- Calidad del microscopio y fuente de iluminación UV.

9.1.2 MATERIALES

- Agitador eléctrico.
- Frascos de vidrio de 1 L de capacidad.
- Láminas portaobjetos para IFI (12 excavaciones).
- Laminillas cubreobjetos.
- Balanza analítica.
- Potenciómetro.
- Probetas de 1,000, 2,000 mL.
- Balones de 5,000 cc capacidad.
- Micropipetas graduadas de:

1	a	10 uL
10	a	100 uL
100	a	1000 uL
- Micropipeta multicanal (8 canales)

10	a	100 uL
100	a	1000 uL
- Tips

- Microplacas para ELISA (de 96 hoyos).

9.1.3 REACTIVOS:

9.1.3.1 Antígenos

De *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae* obtenidos a partir de sangre de individuos con infección primaria reciente (de preferencia) o a partir de cultivos continuos *in vitro*.

La preparación de láminas impregnadas con los antígenos correspondientes se describe y desarrolla en el Anexo N° 4.

9.1.3.2 Sueros

Suero control positivo, control negativo y sueros a ensayar.

9.1.3.3 Conjugados Fluorescentes

Inmunoglobulina de carnero o de cabra anti-IgG y anti-IgM humanas específicas anti inmunoglobulinas totales y marcadas con isotiocianato de fluoresceína (debidamente titulado).

Para cada lote de conjugado que inicie, se recomienda determinar el título óptimo de uso. Seguir el esquema de Titulación de Conjugado (Ver Anexo N° 4).

9.1.3.4 Soluciones

- Solución salina amortiguadora (PBS)*

Cloruro de sodio (ClNa)	8.5 g.
Fosfato disódico (NaHPO ₄)	1.28 g.
Fosfato monosódico dehidratado (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	0.156 g.
Agua destilada	1000 mL
Ajustar el pH a 7.6	
- Solución bloqueadora (Albúmina Sérica Bovina al 1% en PBS)*
- Glicerina al 10% en PBS*
- Azul de Evans al 1%*

Azul de Evans	0.5 g.
PBS pH 7.6	50 mL
- Colorante Giemsa (Descrito en el Anexo N° 2)*

9.1.4

PROCEDIMIENTO:

- Retirar las láminas con antígeno de la congeladora (-70°C) y dejar secar a temperatura ambiente o con una secadora de cabello y aire frío.
- Cubrir los antígenos con 15 ul de solución bloqueadora utilizando una micropipeta graduada y colocarlos en cámara húmeda a temperatura ambiente por 30 minutos (este paso es opcional).
- Paralelamente a la incubación proceda a realizar las diluciones de los sueros empleando las microplacas ELISA siguiendo el siguiente esquema:
Colocar 75 uL de solución bloqueadora en cada uno de los hoyos y 25 uL de los sueros (controles positivo, negativos y sueros a ensayar) solo en el primer hoyo, mezclar y pasar 25 uL de la mezcla al 2do, mezclar y pasar 25 uL al 3ro, y así sucesivamente.

SUEROS	ul	1 :4	1:16	1:64	1:256	1:1024	1:4096
Control Positivo	Sol.Bq.*	75	75	75	75	75	75
	(+)	25	-	-	-	-	-
	Transf.ª		25	25	25	25	25

Control Negativo	Sol.Bq.*	75	75	75	75	75	75
	(-)	25	-	-	-	-	-
	Transf.ª		25	25	25	25	25

Suero Ensayar	Sol.Bq.*	75	75	75	75	75	75
	Sueros	25	-	-	-	-	-
	Transf.ª		25	25	25	25	25

Sol. Bq.* = Solución Bloqueadora Transf.ª = Transferencia

- Lavar las láminas con PBS en una bandeja y sobre un agitador eléctrico durante 5 minutos por 3 veces. Si se realizara manualmente, el tiempo recomendable es 10 minutos por 3 veces.
- Retire las láminas y seque cuidadosamente el exceso de PBS con un papel absorbente (tissue).
- Tome 15 uL de cada una de las diluciones (Sueros positivos, negativos y muestras a ensayar) con una micropipeta y coloque, uno a uno, empezando por la concentración más baja. Siga el esquema adjunto.

	1/4	1/16	1/64	1/256	1/1024	1/4096	
Control (+)	○	○	○	○	○	○	○
Control (-)	○	○	○	○	○	○	○
							PBS

LAMINA SUEROS: PATRON

LAMINA SUEROS: ENSAYAR

- Incubar las láminas a 37°C, en cámara húmeda por 30 minutos.
- Lavar las láminas de la misma manera que en el paso d.
- Agregue el conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína previamente titulado conteniendo Azul de Evans (Solución de contraste al 1:1000) diluido en solución bloqueadora utilizando una micropipeta y coloque en cada hoyo 15 uL de la solución. (Ver Anexo 4)
- Incubar las láminas a 37°C, en cámara húmeda por 30 minutos.
- Lavar con PBS de la misma manera que en el paso d.
- Colocar el Glicerol al 10% en PBS sobre la lámina y cubrir con la laminilla cubreobjetos.
- Examinar al microscopio de fluorescencia con objetivo 40X y ocular 10X.

9.1.5 OBSERVACION MICROSCOPICA

- Rutinariamente las láminas procesadas para observación fluorescente deben ser examinadas al término del procesamiento de la técnica. Si la técnica ha sido aplicada como se recomendó; la reacción fluorescente debe observarse solo en el suero control positivo en presencia del antígeno.
- Como título del suero se considerará la mayor dilución que presente fluorescencia en toda la superficie del parásito. En la reacción negativa los Plasmodia no presentan fluorescencia.
- Para facilitar la observación microscópica deberá utilizar una Ficha de "Registro de Resultados para Prueba IFI" (Anexo N° 7), donde anotará reacciones positivas como presencia de fluorescencia y reacciones negativas como no fluorescentes, en sus respectivas diluciones de sueros y conjugados.
- Si la observación no pudiera hacerse al término del procesamiento puede guardar las láminas (hasta el paso L) en oscuridad y refrigeración 4°C, hasta hacer la lectura (máximo al día siguiente). Considere que con el tiempo la fluorescencia disminuye.

9.1.6 CAUSAS DE ERROR

9.1.6.1 Falsos Positivos

- Conjugados mal titulados.
- Reacciones cruzadas entre diferentes especies de plasmodios.
- Presencia de anticuerpos.
- Mezcla de distintos sueros en las láminas por confluencia.
- Presencia de factor reumatoide.

9.1.6.2 Falsos Negativos

- Iluminación deficiente de microscopio.
- Conjugados mal titulados.
- Sueros controles sin actividad inmunológica.
- Conservación inadecuada de los reactivos.

9.1.6.3 Preparación de reactivos para procesamiento de IFI

Se revisa en detalle en el Anexo 4.

9.1.7 REGISTRO DE RESULTADOS

En el Anexo N° 7 se muestra la ficha para registro de resultados para la prueba de IFI.

9.2 TECNICA DE INMUNO ABSORCION ENZIMATICA (ELISA)

La conjugación de inmunoglobulinas con enzimas abre grandes posibilidades en el inmunodiagnóstico. La prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) sirve para la detección tanto de antígenos como de anticuerpos. Esta técnica tiene ventajas en relación a su uso para el diagnóstico de malaria, es específica y de fácil ejecución y puede ser usada en estudio seroepidemiológico. Permite actualizar anticuerpos monoclonales para antígenos específicos de cada especie de *Plasmodium* e investigar la presencia de antígenos, no sólo en sangre humana, sino en mosquito.

Para el logro de la prueba óptima hay que tener en cuenta:

- Estandarización de la prueba.
- Purificación del antígeno.

9.2.1 MATERIALES

- Micropipeta Multicanal (5 a 50 uL y 50 a 300 uL).
- Frascos de vidrio 1 litro de capacidad.
- Placas de microtitulación de poliestireno.
- Cámara húmeda.
- Lector de Elisa.
- Incubadora.
- Refrigeradora.

ELISA INDIRECTO PARA LA CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS

1. FIJACION DEL ANTIGENO



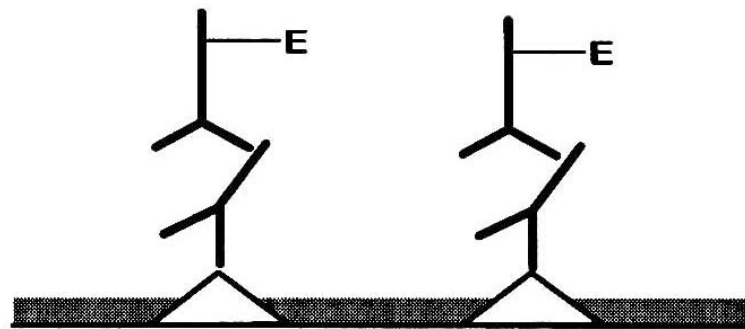
2. LAVADO
3. BLOQUEO



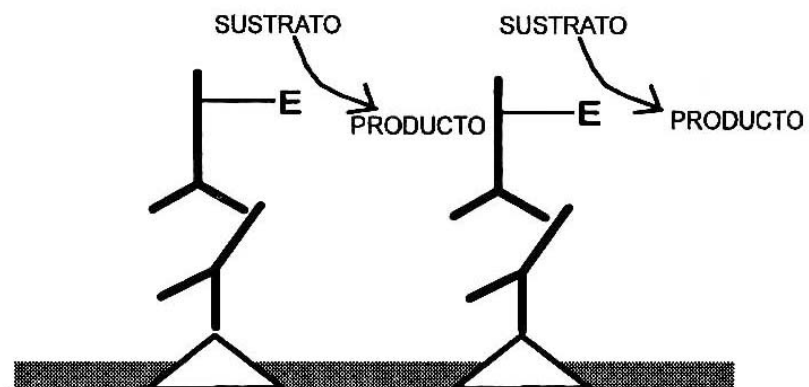
4. LAVADO
5. INCUBACION CON EL ANTICUERPO PRIMARIO



6. LAVADO
7. INCUBACION CON EL ANTICUERPO SECUNDARIO



8. LAVADO
9. INCUBACION CON EL SUSTRATO



9.2.2 REACTIVOS

9.2.2.1 Antígenos

Componentes antigénicos solubles de *P. falciparum* o *P. vivax* obtenidos a partir de sangre de persona con infección primaria reciente o de un cultivo continuo *in vitro*.

9.2.2.2 Sueros

- Suero control positivo.
- Suero control negativo.
- Suero a ensayar.

9.2.2.3 Conjugados

Inmunoglobulinas de camero o cabra anti-IgG y anti-IgM humanas marcadas con peroxidasa.

9.2.2.4 Soluciones amortiguadoras

A. Solución salina amortiguadora de fosfatos (**SAF**) 0,01 M, pH 7,2, con Tween 20 al 0,05%

NaCl	8,183 g
Na ₂ HPO ₄	1,051 g
NaH ₂ PO ₄	0,310 g
H ₂ O destilada c.s.p	1000 mL

Agréguese 0,5 ml de Tween 20, a 1000 ml de SAF.

B. Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6

Solución A

Carbonato de sodio	3,18 g
H ₂ O destilada c.s.p	500 mL

Solución B

Bicarbonato de sodio	2,52 g
H ₂ O destilada c.s.p	500 mL

Agregar a la solución A una cantidad suficiente de la solución B agitando constantemente hasta obtener el pH deseado.

C. Solución amortiguadora de fosfato-ácido cítrico

Acido cítrico	9,6 g
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	11,9 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1000 mL

Si se usa

Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (usar:)	32,5 g
--	--------

Ajuste a pH5 y mantener a temperatura ambiente.

Solución B

Acido cítrico	7,0 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1000 mL

Mézclense cantidades suficientes de la solución A con la solución B agitando, constantemente, hasta obtener un pH de 4,9 a 5,2.

D. Solución amortiguadora de carbonato y seroalbúmina bovina (**SAB**)

SAB (fracción V)	1,0 g
Solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6, c.s.p.	100 mL

E. Solución cromógena (mantener en obscuridad)

OFD (ortofenilendiamina-HCl) 10 mg
Solución amortiguadora de
fosfato-ácido cítrico, pH 5,0 25 mL
Añada H₂O₂ antes de usar. (H₂O₂ 30%) 10 uL

F. HCl 1N

G. Solución amortiguadora de extracción

Urea 48,0 g
SAF, c.s.p 100 mL

9.2.3 PREPARACION DEL ANTIGENO

9.2.3.1 Enriquecimiento de las suspensiones de hematíes parasitados

- Centrifugar los hematíes parasitados obtenidos de cultivo a 1500 r.p.m. por 10 minutos.
- Lavar dos veces el sedimento de hematíes con un volumen del medio de cultivo incompleto cinco veces mayor que el del sedimento.
- Centrifugar a 1500 r.p.m. por 10 minutos.
- Preparar una suspensión de hematíes al 20% en medio de cultivo amortiguado.
- Agregar un volumen igual en solución de gelatina.
- Agitar constantemente hasta homogeneizar la muestra.
- Incubar en baño María a 37°C por 30 minutos.
- Retirar la capa superior que contiene los hematíes parasitados con esquizontes.
- Centrifugar a 1,500 r.p.m. por 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante y suspender el sedimento con un volumen igual de medio de cultivo incompleto.
- Determinar por la coloración de Giemsa la parasitemia de la suspensión. Los antígenos se obtienen de suspensiones con un porcentaje de hematíes parasitados igual o superior al 40%.
- Lavar dos veces los hematíes parasitados con volúmenes de medio de cultivo incompleto cinco veces mayores que el sedimento.

9.2.3.2 Lisis de los hematíes preparados

- Agréguese al sedimento de hematíes parasitados una solución de saponina al 0,04% en medio de cultivo incompleto.
- Agitar rápidamente la muestra para homogenizarla e incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Centrifugar a 3,000 r.p.m. por 15 minutos y lavar el sedimento dos veces con el medio de cultivo incompleto.

9.2.3.3 Extracción de los antígenos de los plasmodios

- Suspender el sedimento obtenido en la solución amortiguadora de extracción.
- Sonificar a 30 Hertz por 4 minutos a intervalos de 30 segundos.
- Centrifugar a 12,000 r.p.m. a 4°C por 30 minutos.
- Descartar el sedimento, retirar el sobrenadante y congelarlo a -70°C o en nitrógeno líquido.

9.2.3.4 Determinación de la concentración protéica del sobrenadante

Se utiliza para ello, el método espectrofotométrico de Warburg-Christian, o el método de Lowry.

9.2.4 SENSIBILIZACION DE LAS PLACAS CON EL ANTIGENO

Se usan placas de poliestireno con 96 cavidades, colocando en cada cavidad 50 uL del antígeno diluido en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0,06 M, pH 9,6.

La dilución en que se debe usar el antígeno se determina por titulación en bloque. Las placas con el

antígeno se incuban a 37°C por 2 horas y a 4°C por 18 horas.

9.2.5 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA (ELISA)

- Retirar las placas del refrigerador y lavar 3 veces con SAF- Tween 20 al 0,05% durante 5 minutos.
- Agregar a cada cavidad de la placa 200 uL de una solución de SAB al 1% en *solución amortiguadora Carbonato-Bicarbonato* 0,06 M, pH 9,6, e incubar a 37°C por una hora para bloquear cualquier reacción inespecífica.
- Lavar las placas 3 veces con SAF Tween 20 al 0,05% por 5 minutos.
- Agregar 50 uL de cada dilución de los sueros a las cavidades de la placa. Los sueros patrón y de referencia deberán titularse y los que se ensayen deberán diluirse a 1/50 y 1/100. Todos los sueros deben diluirse en SAF con 0,05% de Tween 20.
- Incubar a 37°C por 120 minutos en cámara húmeda.
- Lavar las placas 3 veces con SAF Tween 20 al 0,05% por 5 minutos.
- Agregar 50 uL del conjugado marcado con la enzima, diluida según su título en SAF con 0,05% de Tween 20 en cada cavidad, e incubar a 37°C por 60 minutos.
- Lavar las placas 3 veces con SAF Tween 20 al 0,05% por 5 minutos.
- Agregar 100 uL de la solución cromógena, recientemente preparada, homogeneizar e incubar por 15 minutos lejos de la luz.
- Bloquear la reacción enzimática con 50 uL de HCL al 1N.
- Leer en el espectrofotómetro a 492, 405 ó 630 nm, según la enzima que esté utilizando.

9.2.6 CALCULO DEL TITULO DEL SUERO

El título del suero se puede calcular con una o dos diluciones de los mismos desde que haya linealidad entre la dilución y la densidad óptica.

9.2.6.1 Para una dilución del suero se emplea la fórmula:

$$T = \log D + \frac{\log DO - \log DO_{Lm}}{k}$$

$$K = \frac{\text{Antilog DO}}{\text{Antilog D}}$$

Donde:

D = dilución del suero;

DO = densidad óptica a 492 nm de la dilución D;

DO_{Lm} = densidad óptica a 492 nm del umbral (límite inferior) de reactividad entre sueros reactivos y no reactivos; y

K = relación entre la variación del aumento de la DO y la variación de las diluciones de los sueros patrón, dada por la inclinación de la recta obtenida en gráficos

9.2.6.2 Para dos diluciones del suero se emplea la fórmula:

$$T = \log D1 + \frac{(\log DO1 - \log DO \text{ "límite inferior"}) \times (\log D2 - \log D1)}{\log DO1 - \log DO2}$$

Donde:

D1 y D2 = diluciones del suero y

DO1 y DO2 = densidades ópticas de las diluciones D1 y D2, respectivamente

9.2.6.3 El "límite inferior"

Se determina con 15 a 20 sueros reactivos usando la fórmula

$$\text{Límite inferior} = X + 2 \text{ DE}$$

Donde:

X = media aritmética de las densidades ópticas de los sueros no reactivos y

DE = desviación estándar.

9.2.7 INTERPRETACION DE LA PRUEBA

- El resultado de la prueba ELISA puede expresarse en títulos o en grados de absorción. En ese caso, el blanco debe dar una lectura inferior a 0,100 y los sueros negativos, lecturas hasta de 0,200. Los sueros se considerarán positivos cuando las lecturas corregidas sean superiores a 0,500.
- Como blanco de la prueba para colocar el espectrofotómetro en cero deben utilizarse todos los componentes de la misma con excepción de la muestra con suero.

9.2.8 CAUSAS DE ERROR

9.2.8.1 Falsos positivos

- Reacciones cruzadas entre diferentes plasmodia.
- Placas mal bloqueadas.
- Antígenos y conjugados mal titulados.
- Solución cromógena alterada.
- Factor reumatoide.
- Placas plásticas inadecuadas.

9.2.8.2 Falsos negativos

- Antígenos y conjugados mal titulados.
- Exceso de bloqueador.
- Solución cromógena alterada.
- Placas plásticas inadecuadas.

9.2.9 OBSERVACIONES

- La cantidad y concentración óptima de los diferentes reactivos dependen de sus respectivas características particulares.
- Las muestras de suero pueden diluirse 1:50 y 1:100 con las soluciones amortiguadoras apropiadas para determinar el título.
- Las concentraciones óptimas de los antígenos y los conjugados deberán determinarse por titulación en bloque.
- Las muestras de suero deben someterse a examen por duplicado o triplicado.
- En cada placa plástica deberán someterse a prueba sueros control positivos y negativos, diluidos en serie. De esta manera, se podrá determinar los títulos de las muestras objeto de estudio en una o dos diluciones, según las condiciones de la reacción del día.
- El volumen de los componentes de la prueba puede variar según la normatización que realice cada laboratorio.
- El tiempo de incubación de las distintas etapas de la técnica de **ELISA** puede ajustarse según las condiciones locales.
- La dilución de los sueros y del conjugado debe efectuarse con una solución amortiguadora que contenga **SAB** al 1%.
- En las publicaciones pertinentes hay innumerables variaciones en lo que respecta a la preparación del antígeno. Algunas de estas variaciones indican que es posible efectuar la extracción de los componentes antigénicos, sin realizar la concentración de esquizontes con plasmagel. Para retirar los restos de las membranas de hematís se puede centrifugar el antígeno en gradiente de Ficoll P 400 al 27%(P/V). También se puede efectuar la sonicación del antígeno en **SAF**.

CAPITULO X

TECNICAS *IN VIVO* / *IN VITRO* PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE *Plasmodium falciparum* A DROGAS ANTIMALARICAS

10.1 INTRODUCCION

La vigilancia sistemática de los fracasos del tratamiento en lugares donde se puede efectuar el diagnóstico microscópico puede actuar como sistema de alerta acerca de los problemas de eficacia del tratamiento. Las Pruebas In Vitro/ In Vivo recomendadas por la OMS están dirigidas, esencialmente, a determinar el efecto de un medicamento sobre los parásitos, y son una de las bases para la adopción de decisiones de política farmacéutica nacional.

10.2 CRITERIOS DE INCLUSION:

Personas enfermas con diagnóstico parasitológico a malaria por *Plasmodium falciparum*. Además, la densidad parasitaria debe ser más de 1,000 y menos de 80,000 parásitos/mm³ de sangre para la prueba *in vitro* y de 1,000 a 10,000 parásitos/mm³ de sangre para la prueba *in vivo*.

10.3 CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Pacientes que hayan recibido tratamiento antimalárico con 4-aminoquinoleinas los 14 últimos días o sulfadoxina-pirimetamina en los últimos 28 días.
- Pacientes muy enfermos o con vómitos.
- Pacientes con enfermedades renales.
- Pacientes positivos a la prueba de Dill-Glazko.
- Pacientes positivos a la prueba Bratton-Marshall modificada.

10.4 PROCEDIMIENTO:

10.4.1 Identificación del parásito:

Se hará bajo el sistema de examen de lámina.

10.5 PREPARACION DE LA LAMINA:

Las láminas serán preparadas bajo la técnica de la gota gruesa y extendido. (Ver Capítulo I: Preparación de la gota gruesa y el frotís).

10.6 EXAMEN DE LAS LAMINAS:

Para el examen de la gota gruesa y el frotís emplearemos el procedimiento descrito en el Capítulo I : Observación microscópica.

10.7 CONTEO DE LOS PARASITOS:

La técnica utilizada es contar los parásitos en relación con el número de leucocitos observados en la gota gruesa. (Ver procedimiento en Capítulo VI : Cálculo del número de parásitos por microlitro de sangre).

10.8 PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA “IN VIVO”:

10.8.1 Organización de Procedimientos de selección:

Además de tener en cuenta los criterios de exclusión y de los requisitos arriba mencionados para la población a estudiar, se establecerá el siguiente programa de actividades:

- Se determinará el peso del paciente (la dosificación se fija siempre por el peso corporal).
- Se calculará la dosificación apropiada (mg. de base por Kg de peso corporal).
- Se preparará otras extensiones de sangre (extensión pre terapéutica del día 0).
- Se administrará del medicamento de prueba.
- Se observará atentamente.

10.8.2 Extensión de gota gruesa:

Lo ideal, es que una extensión en gota gruesa tenga unos 20 leucocitos por campo microscópico a un aumento total de 700X.

10.8.3 Rotulado de la extensión de sangre:

Hay dos fuentes principales de extensión de sangre en los estudios *in vivo*:

a) Encuesta de selección:

- Número de orden:

Este número está reservado a una persona determinada, y si esta persona es elegida, el número se mantendrá durante la prueba.

- Situación:

Una clave de dos o tres letras identificará la localidad en que se hace el estudio.

- Fecha:

La fecha será aquella en que se hizo la extensión de sangre correspondiente; la selección puede durar varios días.

b) Día 0 (cero) y días siguientes:

- Día de estudio:

Una vez elegido un caso para el estudio, se hará una segunda extensión, inmediatamente antes de administrar tratamiento. Esta es la extensión del día 0. A continuación se harán extensiones cada día, o a intervalos prefijados, y éstos se rotularán según el número de días transcurridos desde el día 0. Por consiguiente, al final de una prueba de 7 días se tendrá la extensión original de selección, la extensión del día 0 hecha inmediatamente antes del tratamiento, y las extensiones de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

- Número de Orden:

Este es el número original adjudicado al paciente cuando fue seleccionado. No cambia nunca y no se dará a otro paciente en la misma localidad.

- Situación:

La misma que la extensión de selección.

- Fecha:

La fecha es aquella en que se hizo la extensión; si la extensión del día 0 está fechada el 22.2.1995, entonces la extensión del día 7 estará fechada el 29.2.1995.

El rotulado se hará directamente sobre la extensión fina con un lápiz de carbón color negro, no altera el portaobjeto y desaparece cuando la lámina se lava con detergente.

10.8.4 Examen de las extensiones de sangre:

Para los estudios *in vivo*, se requerirá tres tipos de examen de sangre:

- Para seleccionar pacientes de posible inclusión en el estudio.
- Para comprobación de especies y una estimación de la densidad parasitaria.
- Para recuento definitivo de la densidad parasitaria.

10.8.5 Cálculo de la dosis y administración de drogas:

Se utilizarán medicamentos de procedencia conocida (Programa de Malaria). Las tabletas desgastadas o accidentalmente rotas no se utilizarán. Como la parte activa del medicamento es la base, la dosificación se calculará siempre en términos de la base del medicamento y del peso (en Kg.) de la persona tratada, siguiendo el esquema de tratamiento según la OMS, 1979.

Para el grupo que será tratado con cloroquina, la dosificación a administrar por vía oral será de 25 mgrs./Kg. de peso, durante tres días; y para el grupo que será tratado con sulfadoxina-pirimetamina, la dosificación a administrar por vía oral será de 25 mgrs./Kg. de peso de sulfadoxina y 1.25 mgrs./Kg. de peso de pirimetamina en dosis única.

Después de la administración de las drogas antimaláricas, se hará un seguimiento diario al paciente con la correspondiente toma de muestra hemática de Gota Gruesa y su respectivo examen para verificar la desaparición de la parasitemia en ambos grupos, durante 7 días y 21 días. Los planes y regímenes medicamentosos serán aprobados y activamente vigilados por un médico epidemiólogo calificado, quien prescribirá la terapéutica de sostenimiento que proceda si el curso de la infección malárica lo requiere. (Emplear formatos descritos en anexos 8, 9 y 10).

10.9 PROCEDIMIENTO PARA LA PRUEBA “IN VITRO”:

10.9.1 Estuche de micropueba:

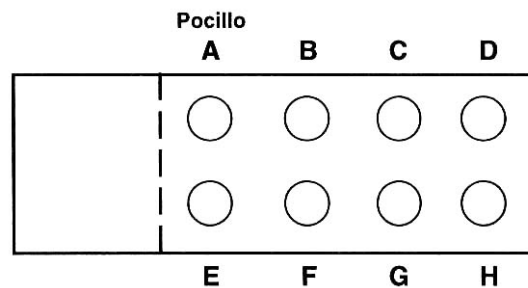
Se empleará el estuche de micropueba *in vitro* (MARK II) para la evaluación de la respuesta del *Plasmodium falciparum* a la cloroquina, y a la sulfadoxina-pirimetamina, recomendado por la OMS (1987).

10.9.2 Procedimiento para la micropueba:

- Con la lanceta automática, se punzará el dedo del paciente para aspirar con la ayuda de una pera negra de plástico de 1 mL, 100 uL de sangre en un tubo capilar estéril tratado con heparina. Se traspasará rápidamente la sangre a un tubo Falcón de plástico de 6 mL que contendrá 0,9 mL de medio líquido LPLF (viene en el estuche de micropueba de la OMS) y se pegará una etiqueta debidamente marcada con el número de serie del paciente que se va analizar. Se cierra el tubo con el tapón y se agitará para mezclar la sangre con el medio.
- Se hará las extensiones y preparaciones en gota gruesa previas al cultivo.
- La mezcla sangre/medio se mantendrá estable varias horas y los tubos podrán transportarse en el bolsillo del pecho para mantener el contenido a una temperatura aproximadamente igual a la corporal. Si el tiempo de transporte será superior a 4 horas, se mantendrá conservado en hielo húmedo. Una temperatura ambiente de más de 40°C destruirá los parásitos.
- Se quitan las tiras de plástico de precintado que cubre los pocillos de la placa (viene en el estuche de la micropueba de la OMS).
- Todos los pocillos de la fila apropiada (una fila por cada paciente analizado) se dosifican con 50 uL de la mezcla sangre/medio (1:9) usando la pipeta Eppendorf de 50 uL y una punta estéril desechable suministrada con el estuche. La dosificación se efectuará empezando por el pocillo testigo (A) y se seguirá por orden creciente de concentración hasta el pocillo H. Se agitará de vez en cuando la mezcla sangre/medio en el tubo de 6 mL para asegurarnos de que la sangre se mantenga en suspensión y se distribuya por igual a todos los pocillos. Luego se quita y se descarta la punta desechable estéril.
- Se adapta una nueva punta desechable estéril a la pipeta Eppendorf y se instala la próxima fila exactamente del mismo modo, y así sucesivamente hasta que todas las muestras queden repartidas en partes alícuotas sobre la placa.
- Se coloca la cubierta sobre la microplaca y con un lápiz graso se escriben los detalles de cada paciente analizado sobre la fila correspondiente de la placa.
- Se agita la placa suavemente para tener la seguridad de que el fármaco depositado en los pocillos ha quedado completamente disuelto.
- Se toma el tarro de velas de la incubadora (regulada para asegurar una temperatura interna de 37,5°C en

el tarro; es sumamente importante, precalentarlo durante una hora como mínimo) y se carga con las placas que van a incubarse. Se encienden dos velas (sólo deben usarse las velas de parafina pura suministras con el estuche) y se coloca una a cada lado de la pila de placas. Se evitará poner las velas encima de las placas. Póngase la cubierta en el tarro de velas sellándolo bien, pero con el grifo de evacuación en posición abierta. Cuando la segunda vela esté a punto de apagarse, ciérrase el grifo de evacuación.

- Se coloca el tarro de velas en la incubadora y se anota la hora.
- Se incuba el contenido a 37,5°C durante 24-30 horas (según la fase de desarrollo de los trofozoitos en el frotís previo al cultivo).
- Tras la incubación se cosecha el contenido de los pocillos quitando el líquido que sobrenada con tubos capilares de 50 uL (y la pera de caucho negro para aspirar) y se traspasan los glóbulos rojos depositados en el fondo plano de los pocillos a un portaobjetos limpio, para formar una serie de gotas gruesas dispuestas en serie como se muestra en la figura siguiente.



- Antes de teñirlas, se seca cuidadosamente las preparaciones en gota gruesa resultantes, pues de otro modo se desprenderán espontáneamente del portaobjeto. Normalmente, se necesitan 24-48 horas para secarlas al aire, pero este plazo puede acortarse secándolas en una estufa a 37,5°C (30 minutos).
- Las preparaciones en gota gruesa se tiñen durante 30 minutos con Giemsa diluido al 1% (v/v) en agua de 7,2 de pH. Dejar secar.
- Luego se procede al examen de la gota gruesa para el recuento de esquizontes. Para que la prueba sea aceptable, se tendrá en cuenta que la proporción de esquizontes maduros debe ser del 10% o más (es decir, 20 esquizontes con tres o más núcleos por 200 parásitos asexuados). Esta cifra se expresará como porcentaje de la obtenida en el testigo.
- Para el caso de las preparaciones en gota gruesa con sulfadoxinapirimetamina, se tendrá en cuenta: presencia de trofozoitos, presencia de esquizontes con 3-7 núcleos y esquizontes anormales, y presencia de esquizontes normales con 8 núcleos o más.
- Los resultados de las pruebas, inmediatamente, después de conocerse se anotarán en la ficha de la OMS. (Ver Anexo 10).

10.10 EVALUACION DE LA EXCRECION URINARIA DE CLOROQUINA (PRUEBA DE DILL Y GLASKO)

10.10.1 Reactivos

Eosina (amarillenta) 50 mg
 Cloroformo 100 mL
 Acido clorhídrico 1N 1 mL

Pesar 50 mg de eosina (amarillenta) y depositarlo en un pequeño embudo por separado con tapón de vidrio. Añadir 100 mL de cloroformo (con calidad de reactivo) y 1 mL de ácido clorhídrico 1N y agitar la mezcla manualmente durante unos minutos, hasta que el cloroformo tome un color amarillo claro por disolución de la eosina. Dejar en reposo hasta que se separe la capa de cloroformo que puede pasarse a un frasco de color pardo con tapón de vidrio para su conservación.

10.10.2 Procedimiento

Vertir 10 gotas de reactivo de Dill-Glasko en un pequeño tubo de ensayo de 2 mL de orina y mezclar agitando, enérgicamente, unos minutos. El cambio de color amarillo a rojo-violeta en la capa de cloroformo precipitado indica la presencia de Amodiaquina o Cloroquina en la orina.

Los resultados obtenidos en esta prueba de coloración son totalmente fiables durante un período de 48 horas después del tratamiento.

10.11 EVALUACION DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE SULFONAMIDAS (PRUEBA DE BRATTON-MARSHALL MODIFICADA)

10.11.1 Reactivos

Reactivo 1:

Solución de nitrito de sodio, 0,03 mmol/l ó 0,2 mg/l ó 0,2% (p/v) en agua destilada.

Reactivo 2:

Acido clorhídrico (concentrado).

Reactivo 3:

Solución de Bratton-Marshall: disuélvanse 20 mg de clorhidrato de N-(1-naptil)-etileno diamina en 20 mL de agua destilada, agregando 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado.

Los reactivos 1 y 2 son estables a la temperatura ambiente. El reactivo 3 es estable durante un mínimo de dos meses si se mantiene a 5-10°C en un frasco oscuro.

10.11.2 Procedimiento

- Con una pipeta se coloca 1 mL de orina en un tubo de ensayo.
- Se agrega una gota de solución de nitrito sódico (reactivo 1) y 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, y se mezcla con cuidado. Se deja reposar durante un minuto.
- Se agregan 3 gotas de Bratton-Marshall (reactivo 3) y se mezcla.

10.11.3 La evaluación de la prueba

- Es Positiva para sulfadoxina libre y para otras arilaminas diazotizables cuando la solución presenta un color púrpura persistente.
- Es Negativa si la solución no adopta el color púrpura o si este color desaparece rápidamente y se transforma en un tono verduzco o marrón.

10.12 MEDICAMENTOS ESTUDIADOS:

10.12.1 Cloroquina

La Cloroquina, droga antimalárica de acción esquizonticida sanguínea presenta una composición química de 7-cloro (4-dietilamino-metil butalamina) quinoleína.

Sus nombres comerciales son: Aralen[®], Alvoclar[®], Resoquin[®] y Nivaquina[®].

Su presentación está en frascos de comprimidos. Cada tableta es de 250 mg de sal de fosfato de Cloroquina (Aralen[®], Alvoclar[®], Resoquin[®]) que contiene 150 mg de principio activo (base). Cada tableta de 200 mg de sulfato de Cloroquina (Nivaquina B[®]) contiene 150 mg de base.

10.12.2 Sulfadoxina-Pirimetamina:

La sulfadoxina-pirimetamina, droga antimalárica compuesta de acción esquizonticida sanguínea presenta una composición química de N´-(5,6-dimetoxi-4-pirimidinil)-sulfonilamida y de 2,4-diamino-5-clorofenil-6-etilpirimidina.

Su nombre comercial es: Fansidar[®].

Su presentación es en frascos de comprimidos.

Cada comprimido contiene 500 mg de sulfadoxina con 25 mg de pirimetamina.

10.13 REGISTRO DE RESULTADOS:

Los resultados de las pruebas tanto *in vivo* como *in vitro* serán registrados en los formularios recomendados por la OMS, (Anexos 9 y 10).

10.14 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

Droga	Respuesta Satisfactoria	Indicación de Resistencia
	Inhibición completa de Esquizontes	Crecimiento de Esquizontes
Cloroquina	4 Pmol a menos	8 Pmol a más
Mefloquina	(*)	64 Pmol a más
Quinina	128 Pmol a menos	256 Pmol a más
Amodiaquina	2 Pmol a menos	4 Pmol a más

* Determinación crítica de concentración pendiente (en la base de comparación de la prueba *In Vivo* a *In Vitro*).

CAPITULO XI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AMBROISE-THOMAS, P (1981). L'immunofluorescence dans la serologie du paludisme. Ginebra WHO/MAL/81.953:1-6.
2. ALMEIDA-FILHO, SOUZA, J. M., (1983). Prueba sencilla para determinar sulfonamidas en orina. Bol. Of. San. Pan.,10:378-379.
3. FAJFAR WHETSTONE, JO. C.I., COLLINS, W.E. and RISTEC, M. (1987). *In vitro* and *in vivo* adaptation of the Geneva/SGE-1 strain of *Plasmodium falciparum* to growth in a squirrel monkey (Saimiri Sciureus) model Am. J. Trop. Med. Hyg, 36 (2) 198: 221-227.
4. GARCIA VIDAL, J.; NGIRABEGA, J. D.; SOLDEVILA, M.; NAVARRRO, R. & BADA, J. L., (1989). Evolution of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs in Rwanda 1985-1987. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 83: 490.
5. HALL, C. I., HAYNES, J. D. (1978). Cultured *Plasmodium falciparum* used as in a malaria indirect fluorescent antibody test. Am J. Trop Med. Hyg. 27: 849-852.
6. JENSEN, B. (1988). *In vitro* cultivation of malaria parasites. In: Malaria Principles and practice of Malariology. Vol. I Wernsdorfer W.H. and Mc. Gregor Sir I (eds) Churchill Livingstone, págs. 307-329.
7. LELIJLD, J. & KORTMANN, H., (1970). The eosin colour test of Dillan Glazko: a simple field test to detect chloroquine in urine. Bull. World Health Org., 42: 477-479.
8. NAJERA, J. A.; LIESE, B. H. & HAMMER, J., (1992). Malaria: New Patterns and Perspectives. World Bank Technical Paper Number 183. The World Bank. Pág. 7.
9. NGUYEN-DINH, P. & TRAGER, W., (1978). Chloroquine resistance produced *in vitro* in a African strain of human malaria. Science. 200: 1397-1398.
10. NGUYEN-DINH, P., (1985). Etudes sur la chimiorésistance de *Plasmodium falciparum* en Afrique: données actuelles. Annales de la Societé Belge de Medecine Tropicale, 65 (suppl. 2); 105-113.
11. NGUYEN-DINH (1988). Handling, preservation, storage and transportation of malaria parasites. Malaria Principles and practice of Malariology In: Wernsdorfer W.H. and Mc. Gregor Sir Y (Eds) Churchill Livingstone pp 1801-1811.
12. ONORI, E.; PAYNE, D.; GRAB. B.; HORST, H.I.; ALMEIDA FRANCO, J. & JOIA, H., (1982). Incipient resistance of *Plasmodium falciparum* to chloroquine among a semi-immune population of the United Republic of Tanzania. I. Results of *in vivo* and *in vitro* studies and of an ophthalmological survey. Bulletin of the World Health Organization. 60: 77-87.
13. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD OMS (1973). Quimioterapia del paludismo y Resistencia a los medicamentos antipalúdicos. Serie de Informes Técnicos N° 711 págs. 30-45. Ginebra.
14. OMS, (1975). Manual para el diagnóstico Microscópico de la Malaria. Cuarta Edición, Publicación Científica N° 276, págs. 1-105. Ginebra.
15. PAYNE, D. (1984). Practical aspects of the use of the standard WHO *in vitro* macro and microtests systems for the determination of the sensitivity of *Plasmodium falciparum* to chloroquine, mefloquine, amodiaquine and quinine. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. Documento inédito MAP/84.2.
16. RESTREPO, M. et al., (1985). Resistencia de *P. falciparum* a la Sulfadoxina-Pirimetamina., Cong. Lat. Amer. Paras., Ecuador, octubre.

17. RICSE, C. et al., (1993). Evaluación de la Efectividad de la cloroquina y fansidar-primaquina en el tratamiento de la malaria por *P. falciparum* en el Valle San Juan de Bigote-Piura. Cong. Per. Paras. Enf. Infec. Trop., julio.
18. RIECKMANN, K. H. & LOPEZ ANTUÑANO, F. J., (1971). Chloroquine resistance of *Plasmodium falciparum* in Brazil detected by a simple *in vitro* method. Bulletin of the World Health Organization. 45: 157-167.
19. SPENCER, H. C., (1985). Drug-resistant malaria-changing patterns mean difficult decisions. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 79:748-758.
20. SULZER, A. J., WILSON M., (1969). Indirect fluorescent-antibody test for parasitic diseases. Am. J. Trop. Med. Hyg. 18:1999-205.
21. TRAGER W., JENSE J. (1976). Human malaria parasite in continuous culture. Science 193,673,675.
22. VALERA, C. V. & SHUTE, G. T., (1976). Preliminary studies on the response of *Plasmodium falciparum* to chloroquine in the Philippines, with the *in vitro* technique. Bulletin of the WHO, 53: 391-378.
23. VOLLER A. R. (1974). A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. Bull. WHO 51:209-211.
24. VOLLER C. (1988). The immunodiagnosis of malaria. In: Malaria Principles and practice of Malariology. (Wernsdorfer W.H. and Mc. Gregor, I, Eds). Churchill, Livingstone, págs. 815-825.
25. WORLD HEALTH ORGANIZATION (1987). Instructions for use of the *in vitro* micro-test Kit for the assessment of the response of *Plasmodium falciparum* to Chloroquine, Mefloquine, Quinine, Sulfadoxine/Pyrimetamine and Amodiaquine. MAP/87/2. Ginebra, págs. 1-17.

CAPITULO XII

(ANEXOS)

ANEXO 1

PRECOLORACION DE LA GOTA GRUESA

La precoloración es el tratamiento de la gota gruesa con azul de metileno fosfatado, que se realiza en el campo antes de someterla al proceso completo de coloración.

Tiene por objeto procurar una mejor coloración y por ende, facilitar el diagnóstico; además, evita que las láminas que se demoran en el campo se contaminen con hongos. La precoloración debe hacerse no antes de 2 ni después de 24 horas de tomada la muestra. Si se hace antes de las 2 horas la gota se desprende y se pierde la muestra. Si se hace después de 24 horas la sangre se reseca, la deshomoglobinización se dificulta, o la gota se contamina con hongos.

A.1.1 TECNICAS DE LA PRECOLORACION

- Preparar la solución de azul de metileno fosfatado siguiendo las indicaciones del sobre “1 g (diluir en 1/4 de litro de agua destilada)”. Preparar también el agua amortiguada siguiendo las indicaciones del sobre “Fórmula 6/5”.
- Las soluciones así preparadas se guardarán cada una en su frasco respectivo. La solución de azul de metileno podrá ser usada hasta que se observen precipitaciones, de acuerdo al volumen de muestras deshomoglobinizadas, al cabo de los cuales, se desechará y se preparará una nueva.
- En un vaso verter azul de metileno en cantidad suficiente de que una lámina en posición vertical sea cubierta la gota gruesa por la solución. Contar “uno”, “dos” (un segundo), sacarla inmediatamente después y hacerla escurrir verticalmente sobre la esponja de plástico.



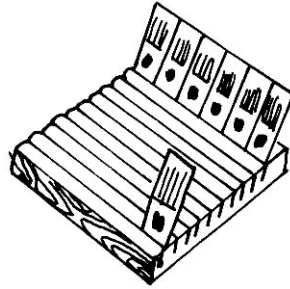
- Debe tenerse la precaución de no dejar el “extendido”, donde se encuentra la identificación de la muestra; porque si se mojara se perdería la identificación.
- En un vaso que contenga agua Tamponada, hacer el primer enjuague, introduciendo la lámina hasta que el agua cubra la gota. Mantenerla introducida mientras se cuenta “uno”, “dos”. Sacarla inmediatamente después y hacerla escurrir nuevamente sobre la esponja de plástico.



- En otro vaso que contenga agua tamponada, hacer el segundo enjuague, introduciendo la lámina hasta que cubra únicamente la gota, sucesiva y rápidamente de 5 a 10 veces, inmediatamente después hacerla escurrir, por tercera vez, en la esponja.



- Dejar que seque la gota, colocándola verticalmente en el soporte de madera proporcionalmente al efecto.



A.1.2 EMBALAJE Y ENVIO

- Después de la precoloración, cada lámina o grupo de láminas deben envolverse en el formulario correspondiente (Programa de Malaria).
- Para enviar las muestras al laboratorio correspondiente, se hará un paquete cuidadosamente protegido con cartón y marcando la dirección correspondiente, indicando:
 - Nombre del destinatario.
 - Nombre del remitente.
 - Cantidad de láminas remitidas.

ANEXO 2

PREPARACION DE REACTIVOS Y COLORANTES

A.2.1 PREPARACION DE LA SOLUCION ALCOHOLICA GIEMSA ("Solución madre")

FORMULA:

Colorante Giemsa en polvo, certificado 0,75 g
Alcohol metílico puro (sin acetona) 65.00 mL
Glicerina pura 35.00 mL

Estas cantidades son suficientes para preparar 100 ml. de solución "madre". Agregue, los ingredientes directamente a una botella de tamaño adecuado que contenga perlas de vidrio macizo, limpias de diámetro no mayor que 5 mm.

Agitar la botella intensamente de 6 a 10 veces al día, durante 3 días como mínimo.

Extraer diariamente una pequeña muestra del colorante preparado, filtrarl a través de papel N° 2, y ensayarlo con extendidos de sangre periférica recién preparados.

Cuando todos los elementos de la sangre aparezcan con sus colores apropiados, el colorante está listo para ser usado.

A.2.2 DILUYENTE

El diluyente, una solución amortiguadora, es un elemento de mucha importancia en la preparación del colorante diluido.

Las sustancias amortiguadoras actúan como un elemento químico "adaptador", inactivando dentro de un margen limitado cantidades variables de ácido o álcali.

El ortofosfato disódico anhidro y el ortofosfato monopotásico son las sales que, con agua destilada, se usan con más frecuencia para preparar la solución amortiguadora. Cuando no se dispone de agua destilada se pueden agregar sales amortiguadoras al agua corriente.

En términos generales, la reacción de los diluyentes que habían dado mejores resultados se acercaba al punto de neutralidad (pH 7.0). En la práctica, la escala oscila generalmente entre un pH 6.6 - 7.4 que es, por coincidencia, la escala del indicador rojo de fenol.

Se puede preparar rápidamente soluciones amortiguadoras eficaces agregando 1 g. de una mezcla de las sales de sodio y de potasio en la proporción de 4:5, o en cualquier otra proporción que haya resultado satisfactoria, a cada litro de agua destilada.

Se mezclan perfectamente dichas sales en las proporciones seleccionadas, se pesa el polvo homogéneo en porciones de un gramo, que se pueden guardar envueltas en papel glasine o bien en frascos disueltas en pequeñas cantidades de agua.

A.2.3 SOLUCION AMORTIGUADORA

Fórmula :

Ortofosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4) 4 g
Ortofosfato monopotásico (KH_2PO_4) 5 g

Mezclar bien, disolver 1 g de la mezcla en un litro de agua destilada y ajustar al pH 7.2.

A.2.4 PREPARACION DEL COLORANTE DILUIDO

Procedimiento:

Utilizar una probeta de vidrio para diluir el colorante.
Prepare la Solución Madre Giemsa al 5% con agua destilada o solución amortiguadora de pH 7.2 (puede ser reemplazada por agua de lluvia o agua hervida fría).

Solución Madre Giemsa 0,05 mL
Agua Destilada 0,95 mL

Una forma sencilla de preparar la dilución es agregando una gota de Solución Madre por mililitro de agua destilada o de solución amortiguadora.

A.2.5 SOLUCION “LUZ AZUL CIELO”

Para el diagnóstico parasitológico de malaria, no es conveniente utilizar luz solar directa ni un foco de vidrio transparente (sí uno de vidrio pavonado). Por otro lado, es indispensable el uso de algún tipo de filtro azul con el objeto de obtener el fondo blanco necesario para la observación de elementos celulares y parásitos.

Quizá una de las mejores adaptaciones (en el caso de microscopios con espejo) es el uso de un balón conteniendo la solución “Luz Azul Cielo”, que hace las veces de filtro.

A.2.5.1 Fórmula de la solución Luz Azul Cielo

Agua destilada 250 mL
Amoníaco 40 mL
Solución Sulfato de cobre al 20% 8 - 10 gotas

Mezcle bien en el balón.

A.2.5.2 Método de Walker

Azul de metileno fosfatado:

Cloruro de metileno (medicinal) 1.0 g
Ortofosfato disódico anhidro (NaHPO) 3.0 g
Ortofosfato monopotásico 1.0 g

Mezcle perfectamente las tres sales en un mortero seco.

Disuelva un gramo de la mezcla en 250 a 350 mL de agua destilada y filtre si es necesario.

Trasvase al balón.

ANEXO 3

LIMPIEZA Y ALMACENAJE DE LAMINAS PORTAOBJETO

A.3.1 Recomendaciones

- Las láminas portaobjeto a utilizarse en la toma de muestras hemáticas para el diagnóstico de malaria mediante el examen de la gota gruesa y el frotís deben ser lavadas y secadas correctamente antes de ser usadas o almacenadas.
- No ponga muchas láminas en el recipiente o lavadero, ya que esto favorece que unas rayen a otras.
- Las láminas limpias deben ser cogidas solamente por los bordes, para evitar dejar sobre su superficie grasa o suciedad de los dedos.
- Es mejor descartar las láminas portaobjetos cuando:
 - Tengan coloración iridiscente o estén opacas.
 - Presentan rayaduras, rajaduras u otras alteraciones de su superficie.

A.3.2 Limpieza de láminas nuevas:

- Lávelas con detergente (remojándolas durante 30 minutos en agua con detergente).
- Enjuáguelas con agua a chorro continuo, o cambiándola varias veces si se enjuagan en un recipiente.
- Pula cada lámina individualmente con una esponja y luego séquela con un trozo de tela de algodón limpia.

A.3.3 Limpieza de láminas usadas:

- Sumérgelas por 60 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (lejía) antes de lavarlos.
- Lávelas, una por una, con agua jabonosa caliente y frota ambas caras con un cepillo. Lávense sólo unos cuantos cada vez para impedir que se rayen.
- Limpiar, uno por uno, con una gasa o torunda de algodón.
- Séquelas con un paño limpio de algodón.

Los portaobjetos ligeramente rayados, inservibles para las extensiones sanguíneas, pueden aprovecharse en el Laboratorio de Entomología para el uso ordinario en el laboratorio.

A.3.4 Almacenamiento:

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

ANEXO 4

PREPARACION DE REACTIVOS PARA PROCESAMIENTO DE MUESTRAS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

A.4.1 OBTENCION DE ANTIGENO

Se obtienen buenos resultados cuando se utiliza sangre con parasitemia mínima del 1% y predominio de esquizontes.

A.4.2 OBTENCION DE ANTIGENOS DE *P. falciparum* y *P. vivax* de sangre humano parasitado

- Preparar un extendido de sangre completa y teñir con el método de Giemsa para contar el número de hematíes parasitados por campo.
- Recoger la sangre con anticoagulante (Heparina 200 UI para 10 mL ó 1 mL de ACD para 10 mL).

A.4.3 PREPARACION DE ANTIGENOS DE *P. VIVAX*

- Después de extraer la sangre, se debe centrifugar a 1500 r.p.m. por 5 minutos.
- Separar el plasma y la capa de leucocitos. Esta operación se debe realizar cuidadosamente ya que los hematíes parasitados están inmediatamente por debajo de la capa de leucocitos.
- Lavar 3 veces los hematíes por centrifugación a 1500 r.p.m. durante 5 minutos en volúmenes de PBS 10 veces mayor que el volumen de sedimento de hematíes.
- Resuspender las células en PBS a su volumen original. Preparar 2 láminas con 3 gotas de 5 uL de suspensión con una micropipeta, secar y colorear por el método Giemsa (Ver Anexo 2). Observar con objetivos de 40X y ocular de 10X para ver la concentración de esquizontes. La concentración ideal es de 20 a 30 esquizontes por campo.
- Depositar 5 uL de la suspensión obtenida en cada hoyo de la lámina.
- Secar las láminas a temperatura ambiente o con una secadora de cabello de aire frío.
- Guardar las láminas a -70°C en un ambiente libre de humedad, después de envolver individualmente con papel absorbente (tissue) y luego en grupos de 10, con papel aluminio o en bolsas de plástico sellado conteniendo sílica gel, para proteger de la humedad.

A.4.4 PREPARACION DE ANTIGENOS DE *P. falciparum* DE CULTIVO *IN VITRO*

Se obtienen buenos resultados con cultivos en medio RPM11640, sincronizados y con alta densidad de esquizontes cuyo procedimiento se detalla en Capítulo VIII. Se emplea el mismo procedimiento para la preparación de antígeno de *P. vivax* con sangre humana parasitada.

A.4.5 SINCRONIZACION

Este procedimiento es empleado para obtener esquizontes a partir de cultivos (en masa) para la preparación de antígenos utilizados en las pruebas serológicas.

A.4.6 REACTIVOS:

A.4.6.1 Solución de Gelatina

a.	RPMI 1640	10.2 g
	Hepes	5.9 g
	NaHCO ₃ al 5%	8 mL
	Agua destilada	1,000 mL

- b. Tomar 192 mL de la solución preparada en el paso “a”, y disolver 2.0 g de gelatina (signa -300 Bloom) en una botella de vidrio en baño María a 60°C con agitador.
- c. Estabilizar a temperatura ambiente y esterilizar por filtración con filtro 0.22 micras de poro (micropore).
- d. Agregar 8 mL de NaHCO₃ al 5% para completar a 200 mL.

A.4.6.2 Procedimiento

- Centrifugar el material de cultivo en tubo de centrifuga de 50 mL a 1500 r.p.m. por 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Medir el volumen del sedimento con una pipeta y hacer una suspensión al 20 % con medio RPMI 1640 completo, mezclar cuidadosamente.
- Agregar el mismo volumen de la solución de gelatina (ejemplo, si la suspensión es de 15 mL, agregar 15 mL de solución de gelatina) mezclar y distribuir en tubos de centrifuga de 15 mL: 5 mL en cada tubo, colocar la tapa y girar sin cerrar completamente.
- Incubar a 37°C por 30 minutos.
- Colectar cuidadosamente los sobrenadantes en un tubo de centrifuga de 50 mL y centrifugar a 1500 r.p.m. por 5 minutos.
- Descartar cuidadosamente el sobrenadante, preparar con el sedimento dos extendidos, fijar y secar para colorear con Giemsa, y observar con objetivo 100X la presencia de esquizontes.
- Lavar las células (sedimento) con PBS a 1500 r.p.m. por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 10 mL de PBS. Si hay mucha concentración de esquizontes diluir con PBS, y si está muy diluido concentrarlo centrifugarlo y separando el sobrenadante.

A.4.7 TITULACION DEL CONJUGADO

- Cada vez que utilice un nuevo lote de antígenos y conjugado tendrá que ensayar o estandarizar los parámetros de cada reactivo.
- La titulación se realiza en bloque utilizando diluciones del conjugado contra diluciones de sueros positivos y negativos conocidos. (Control) Como título del conjugado se considerará la dilución que proporcione la máxima sensibilidad y especificidad.

A.4.7.1 Procedimiento

- Seguir los pasos “a” al “h” del procedimiento de IFI.
- Diluir el conjugado a evaluar en solución bloqueadora conteniendo azul de Evans 1:1000 en diluciones 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, utilizando para ello criotubos.
- Seguir el siguiente esquema de dilución y titulación de conjugado:

DILUCION DEL CONJUGADO

Nº tubo	1	2	3	4	5
Sol. Bloqueadora	350 uL	180 uL	180 uL	180 uL	180 uL
Conjugado	25 uL	--	--	--	--
Evans blue	40 uL	20 uL	20 uL	20 uL	20 uL
Transferencia	--	200 (1)	200 (2)	200 (3)	200 (4)
Dilución	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256

- Preparar las láminas con antígenos para cada dilución de conjugado a ensayar.
- Seguir el mismo procedimiento de incubación descrito en el Procedimiento de la técnica IFI, (Ver Paso b) y lavados (Paso 4d).
- Efectuar la lectura anotando intensidad de fluorescencia en cada reacción.
- La Intensidad de la fluorescencia se registra por cruces :

INTENSIDAD	FLUORESCENCIA
+	fluorescencia nítida
2+	fluorescencia marcada
3+	fluorescencia intensa
4+	fluorescencia muy intensa

A.4.8. INTERPRETACION DE RESULTADOS

Se considerará el título óptimo aquel donde se observe fluorescencia nítida en toda la superficie del parásito (+).

Ejemplo : Dilución del Conjugado

Lote Congelado :

Fecha :

El título de conjugado a una dilución 1:64, corresponde a una mayor dilución con fluorescencia a un título del Suero Positivo de 1: 1024. (Suero positivo N° 7).

TITULACION DEL CONJUGADO					
SUEROS	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Sueros Positivos					
(1)	3+	3+	3+	3+	3+
(3)	3+	3+	2+	2+	2+
(5)	3+	2+	2+	2+	2+
(7)	3+	2+	2+	2+	2+
(9)	2+	2+	1+	0	0
(11)	1+	0	0	0	0
Sueros Negativos					
(1)	0	0	0	0	0
(2)	0	0	0	0	0
(3)	0	0	0	0	0

ANEXO 5
SOLICITUD PARA INVESTIGACION DE MALARIA POR GOTA GRUESA

1. Región / Subregión : Establecimiento de Salud :
2. Apellidos y Nombres :
Edad: Sexo : H.C.I./FF:
3. Procedencia : Dirección Actual :
4. Solicitud para : Diagnóstico : Control : Día de Tratamiento :
5. Fecha : C.N° de caso : Firma del Solicitante :

RESULTADO :

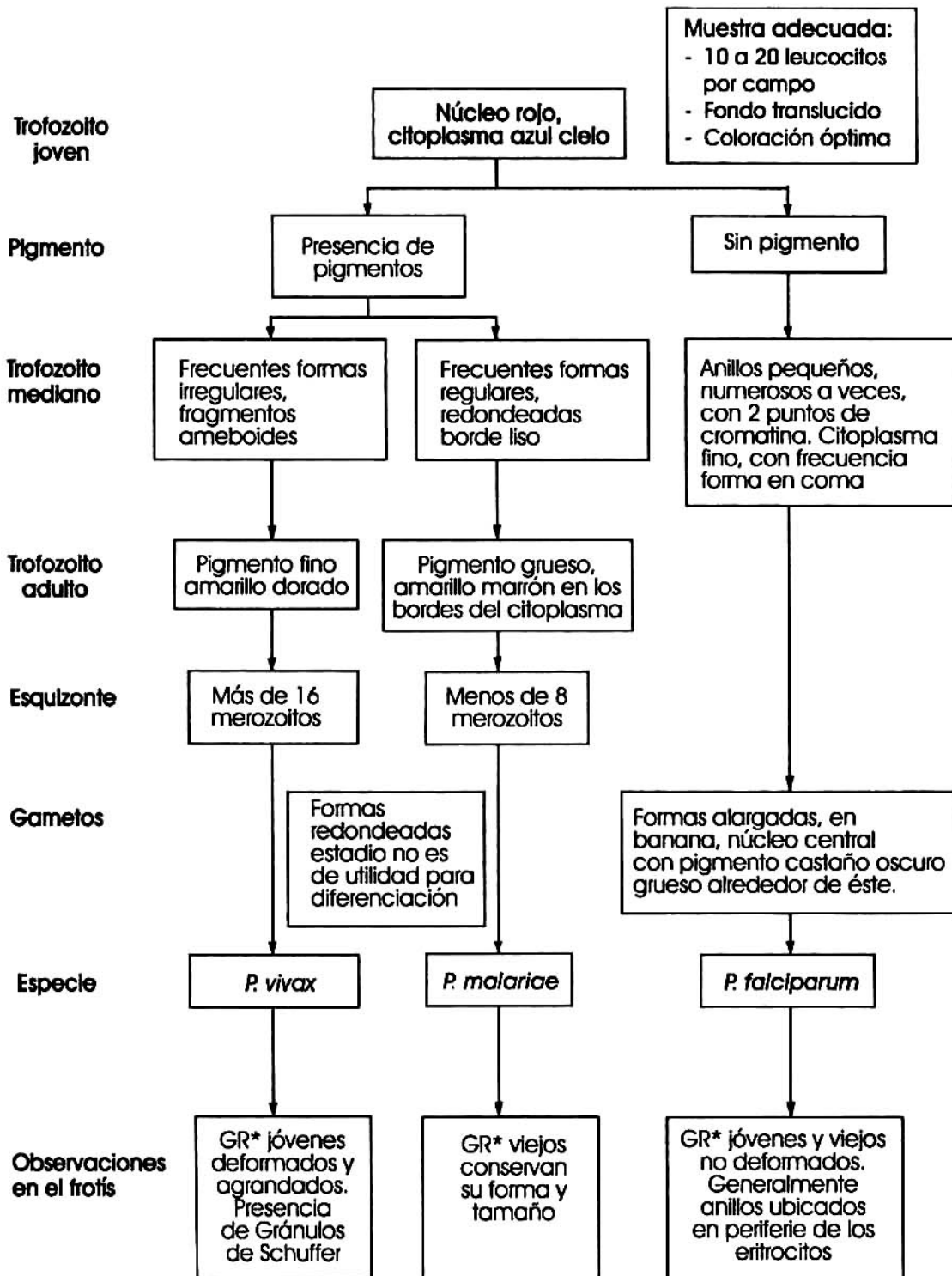
Gota Gruesa : Positivo : Plasmodium : N° de Registro :
Negativo : Fecha :

OBSERVACIONES :
.....

.....
Nombres y Apellidos del laboratorista

EL EXAMEN DE GOTA GRUESA Y FROTIS ES GRATUITO

ALGORITMO PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE MALARIA EN GOTA GRUESA



GR* = Hematíes

ANEXO 6

FICHA DE SUPERVISION DE MALARIA EN EL LABORATORIO DEL NIVEL LOCAL

1. DEL SERVICIO :

Nombre del Establecimiento :

Región **UDES** **Localidad**
 MINSAL () IPSS () FF.PP. () OTROS ()

Responsable : Cargo :

Número de Supervisión :

2. DE LOS ASPECTOS TECNICOS

2.1. Del Personal Responsable del Diagnóstico Parasitológico de Malaria :

Capacitado : SI () NO () Fecha : Lugar :

Condiciones Ambientales :

2.2. Del Manual de Procedimiento : Tiene SI () NO ()

Lo utiliza SI () NO ()

2.3. De la obtención de la muestra :

- Abastecimiento :

Abastecimiento	Udes	Hospital	Programa Malaria	Laboratorio Central	Otros
Colorantes					
Giemsa					
Aceite de Inmersión					
Láminas					
Formularios					
Otros					

OBSERVACIONES :

SUPERVISOR :

- Quién selecciona a los pacientes febriles
- Personas adiestradas para toma de muestra (N°)
- Número de muestras :

Mes	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	Total
Muestra Tomada													
Muestra Positiva													

- Números de Muestras a Supervisar

	Gota Gruesa:		Frotís:	
Tamaño	SI ()	NO ()	SI ()	NO ()
Ubicación	SI ()	NO ()	SI ()	NO ()
Adherencia	SI ()	NO ()	SI ()	NO ()

2.4. Del Registro de la Muestra :

- Rotulado legible : SI () NO ()
- Anotación adecuada en el Cuaderno de Registro : SI () NO ()
- Utiliza numeración correlativa: SI () NO ()

2.5. Cumple medidas de Bioseguridad : SI () NO ()

- Frecuencia de Evacuación de material biológico

2.6. De la Información obtenida:

- Llena adecuadamente la ficha de notificación de casos febriles SI () NO ()

2.7. De los Procedimientos que se ejecutan:

- Conserva adecuadamente Solución Stock SI () NO ()
- Prepara soluciones y/o colorantes SI () NO ()
- Le envía colorantes : SI () NO ()
- Procedencia :
- Proceso adecuado de la muestra SI () NO ()
- Funcionamiento del Microscopio SI () NO ()
- Marca Tipo
- Condiciones Uso de Aceite de inmersión
- Mantenimiento y Conservación del Microscopio :
- Tipo de Conservación
- Fecha de Mantenimiento

2.8. Del Informe de los resultados:

- Tiempo de Entrega de los resultados
- Se entrega oportunamente : SI () NO ()
- Envía consolidado de resultados de Laboratorio oportunamente al nivel intermedio SI () NO ()

2.9. Del Control de Calidad :

- Remite láminas de Gota Gruesa a nivel intermedio:
Fecha SI () NO ()
- Existe documentación de control de calidad SI () NO ()
- Resultado Fecha
- Con que frecuencia formularios

3. PROBLEMAS :

4. RECOMENDACIONES DEL SUPERVISOR (Para ejecución por el personal del laboratorio supervisado):

- Radiestramiento en Diagnóstico Parasitológico de Malaria :
Toma de Muestra () Coloración ()
Diagnóstico de Especies () Uso de Formularios ()
Canalización de Información ()
- Del Microscopio : Mantenimiento () Limpieza () Reparación ()

Fecha:

Hora :

.....
Firma del Supervisor

.....
Supervisado

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
 CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PUBLICA
 Cápac Yupanqui 1400 - Jesús María
 Lima 11 Telfs. 712529 / 719920 - Fax 717443

ANEXO 7

REGISTRO DE RESULTADOS PARA PRUEBA IFI

Conj. : Fecha :
 Ag. : Pág. N°

Cod. Muestra	Dilución N°								Resultados	Observaciones
	4	16	64	256	1024	4096	16384	65536		

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
 CENTRO NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PUBLICA
 Cápac Yupanqui 1400 - Jesús María
 Lima 11 Telfs. 471-2529 / 471-9920 - Fax 471-7443

**ANEXO 7
 (Continuación)**

Conj. : Fecha :
 Ag. : Pág. N°

Cod. Muestra	Dilución N°								Resultados	Observaciones
	4	16	64	256	1024	4096	16384	65536		

ANEXO 8

SEGUIMIENTO ESPECIFICO IN VIVO DE CASOS DE MALARIA TRATADOS

Investigador : _____ Fecha : _____ Caso N° : _____

Nombre del paciente : _____	Domicilio : _____
Edad : _____ Sexo : _____ Peso (kg.) : _____	Primera administración de medicamento (día 0) :/...../.....
Localidad : _____	Marca y Procedencia : _____
Jefe de familia : _____	Tabletas de Cloroquina (características): _____

Día *	Parásitos (** Trofozoitos) / 100 campos				Dosis del medicamento Empleado	Análisis de Orina	Observaciones ***
	Fecha	Especie	Recuento	Por mm ³			
0							
1							
2							
4							
5							
6							
7							
2da. semana							
3ra. semana							
4ta. semana							

Pág. 1 de 2

ANEXO 8 (Continuación)

Día *	Parásitos (** Trofozoitos) / 100 campos				Dosis del medicamento Empleado	Análisis de Orina	Observaciones ***
	Fecha	Especie	Recuento	Por mm ³			
Mes I							
Mes II							
Mes III							
Mes IV							
Mes V							
Mes VI							
Mes VII							
Mes VIII							
Mes IX							
Mes X							
Mes XI							

* Si es posible prolongar la prueba durante 28 días, el examen de la sangre deberá efectuarse dos veces por semana como mínimo. A partir de la semana, los resultados se consignarán del mismo modo.

** Indíquese en esta columna el método de recuento parasitario utilizado (parásitos por 100 campos, por 100 leucocitos o por 10,000 hematíes).

*** Indíquese la temperatura oral, si se ha registrado.

NOTA: Este informe debe ir acompañado de un resumen de la situación epidemiológica en la zona donde se ha practicado la prueba.

Pág. 2 de 2

ANEXO 9

**FORMULARIO PARA DETALLAR LA SITUACION DE CADA PERSONA EN LA PRUEBA IN VIVO;
SEGUN FECHA, DIA DEL ENSAYO Y ACTIVIDAD(ES) QUE HAN DE DESARROLLARSE ESE DIA**

N° IDENT.	REG. MED.	NOMBRE	E	S	PESO EN KG.	FECHA DE ACTIVID. Y DIA CORRESP. DEL ENSAYO, ACTIV. CODIF. P. C/DIA																			

REG. MED. = Régimen medicamentoso
 E = Edad S = Sexo (M = Masculino F = Femenino)
 U = Análisis de orina correspondiente al elemento ensayado
 S = Preparación de sangre, gota gruesa y extensión fina

? = Preguntas relativas a vómitos, diarreas, prurito, etc. en las 24 horas anteriores
 C = Cloroquina
 @ = Prolongar según se necesita

ANEXO 10

**FORMULARIO RESUMIDO DE LOS ENSAYOS IN VIVO/IN VITRO PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD DE
Plasmodium A LOS MEDICAMENTOS ANTIPALUDICOS**

Localidad : Fecha :

N° DE IDENTIFICACIÓN	SEXO	PESO KG.	NOMBRE	RESULTADO DEL EXAMEN MICROSCÓPICO			RESULTADO ANÁLISIS DE ORINA	MEDICAMENTO EN ESTUDIO DOSIS EN MG. DE BASE	
				Positivo Negativo	Si positivo Especie	Parasitos asexuados x mm ³ de sangre	Día 0	Medicamento	Dosis en el día

Esta publicación se terminó de imprimir
en diciembre de 1997 en los
Talleres Gráficos de Art. Lautrec S.R.Ltda.
Av. Paseo de la República 731 – Lima 13
Tel/Fax : 4237616