



GOBIERNO DE LA
REPÚBLICA DOMINICANA

SALUD PÚBLICA

MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LA MALARIA

SANTO DOMINGO
REPÚBLICA DOMINICANA



MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LA MALARIA

**República Dominicana
Junio, 2023**



® **Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social**

Título Original:

Manual para el Diagnóstico Parasitológico de la Malaria

Coordinación técnica editorial:

Viceministerio de Salud Colectiva

Diagramación: Onavis Cabrera. Departamento de Impresos, MISPAS

ISBN: 978-9945-644-12-8

ISBN Electrónico: 978-9945644-13-5

1era edición

Impreso en República Dominicana

Junio, 2023

Documento elaborado con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS)

Copyright © Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social autoriza la utilización y reproducción de este documento para actividades académicas y sin fines de lucro. Su contenido es el resultado de las consultas realizadas con los expertos de las áreas y las sociedades especializadas involucradas, tras el análisis de las necesidades existentes en torno al tema en el Sistema Nacional de Salud.



Autoridades

Dr. Daniel Enrique de Jesús Rivera Reyes

Ministro de Salud Pública y Asistencia Social

Lcdo. Miguel Antonio Rodríguez Viñas

Viceministro de Planificación y Desarrollo

Dr. Eladio Radhamés Pérez Antonio

Viceministro de Salud Colectiva

Dr. José Antonio Matos Pérez

Viceministro de Garantía de la Calidad de los Servicios de Salud

Lcda. Raysa Bello Arias de Peña

Viceministra de Asistencia Social

Dr. Leandro José Villanueva Acebal

Viceministro de Regulación de Productos de Consumo Humano

Dr. Fernando José Ureña González

Viceministro Oficina de Coordinación de la Gestión Desconcentrada de Rectoría

Equipo responsable

Dra. Yocastia Aramboles. Directora de Salud Colectiva
Dra. Gina Beatriz Estrella Ramia. Directora
Dr. Jose Luis Cruz Raposo. Director de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores y Zoonosis
Dra. Altagracia Milagros Peña González. Directora de Normas, Guías y Protocolos

Centro de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores y Zoonosis (CECOVEZ)

Dra. Dania Eunice Vólquez Yenyete. Coordinadora Técnica
Dr. Francisco Esmeldo Camilo Matos. Coordinador de Servicios de Salud
Dra. Keyla Eliasmar Ureña Tatis. Coordinadora Técnica de Proyecto Carter
Dr. Miguel Euclides De La Cruz Marrero. Analista de Epidemiología
Sr. Domingo Cabral. Jefe Operaciones de Campo

Laboratorio de Referencia Nacional para Malaria

Lcda. Anyelina Matos Ferreras. Encargada
Lcdo. Francisco Doble Sale. Bioanalista
Lcdo. Joel Alexander Silfa Sención. Bioanalista
Lcda. Janette Olibrís Estimado. Bioanalista
Lcda. Jairy Peguero. Microscopista de la Red

Revisión General y Asesoría Metodológica

Dirección de Normas, Guías y Protocolos

Departamento de Reglamentación Sanitaria

Dra. Ibsen Sahira Veloz Suárez. Coordinadora de Documentación Sanitaria

Asesoría Técnico Legal

Lcda. Anel Payero González. Coordinadora Técnico Legal de la DNGP
Licda. Kirsys Feliz Alcántara. Encargada de Análisis Legal del VMGCSS
Lcdo. Esteban Arturo Berges. Analista Legal Dirección de Gestión de Riesgo

Unidad Asesora Sustantiva

Dirección de Planificación y Desarrollo

Departamento de Igualdad de Género

Dra. Indiana Barinas. Encargada

Equipo de Apoyo Técnico Externo

Clinton Health Access Initiative

Natalia Tejada. Coordinadora de Proyecto de Malaria en República Dominicana
Nicole Michelen Strofer. Gerente de programa de Malaria en República Dominicana

Banco Interamericano de Desarrollo-BID

José Ramón Valdez. Consultor de malaria iniciativa regional de la eliminación de la malaria

Organización Panamericana de la Salud (OPS)

Lcda. Olivia Brathwaite. Asesora CDE

Dra. María Paz Ade y Torrente. Asesora Regional de Diagnóstico de Malaria y Gestión de Suministros

Mc. Marcela Mendoza Lozano. Consultora Externa

Dr. César Díaz Cortés. Consultor Internacional para malaria

Dra. Silvia Cruz. Consultor Internacional para malaria

Dra. María Tejada. Consultora Nacional

Dra. Emely Fernández Tejada. Consultor Nacional

Asesoría Externa

Dr. Manuel De Jesús Tejada Beato. Asesor

Dr. José Manuel Puello Montero. Asesor Técnico

Dra. Dianelba Valdez Vásquez. Auditora

Dra. Olga Lucía Jape Collins. Médico Salubrista

Contenido

1. Acrónimos, siglas y abreviaturas	9
2. Glosario	10
3. Presentación	13
4. Resolución Ministerial No.....	14
5. Introducción	17
6. Objetivo.....	19
6.1. Objetivo General	19
6.2. Objetivos Específicos	19
7. Ámbito de aplicación.....	19
8. Análisis del marco legal	19
8.1. Antecedentes.....	19
8.2. Marco legal y Normativo	20
9. Política de operación y lineamientos técnicos	21
10. Procedimientos	21
10.1. La Malaria.....	21
10.2. Ciclo de vida.....	22
10.2.1. Fase sexual.....	22
10.2.2. Fase asexuada	23
10.3. Bases del diagnóstico parasitológico de la malaria	23
10.3.1. Diagnóstico microscópico	24
10.3.2. Diagnóstico mediante pruebas rápidas	49
10.4. Algoritmo para el diagnóstico y tratamiento de la malaria no complicada.....	54
10.5. Reporte de resultados	54
10.5.1. Reporte de casos	55
10.5.2. Registros del nivel local	55
10.6. Indicadores relacionados con el laboratorio	56
10.7. Control de insumos y reactivos	58
10.8. Manuales y registros.....	60
10.8.1. Manuales.....	60
10.8.2. Registros	60
10.8.3. Sistema de archivo.....	61
10.8.4. Trazabilidad.....	61

10.8.5. Personal	61
10.9. Programa de mantenimiento preventivo y correctivo de microscopios.....	62
10.10. Medidas de bioseguridad	63
10.10.1. Medidas de bioseguridad personal	63
10.10.2. Seguridad de la infraestructura	64
10.10.3. Manejo de muestras	65
10.10.4. Manejo de sustancias químicas	65
10.10.5. Manejo de desechos.....	65
10.10.6. Accidentes laborales	66
10.10.7. Instrucciones para el lavado de manos	66
11. Referencias	67
11.1. Referencias bibliográficas.....	67
11.2. Bibliografía	69
12. Anexos	71
Anexo A. Registro de búsqueda activa MAL-0-01	71
Anexo B. Formulario de notificación pasiva (MAL-0-03) e instructivo de llenado	72
Anexo C. Reporte de laboratorio (MAL-0-04) e instrucciones de llenado	73
Anexo D. Morfología de <i>P. falciparum</i>	75
Anexo E. Morfología de <i>P. vivax</i>	76
Anexo F. Formulario para informe semanal de notificación de casos positivos.....	77
Anexo G. Informe semanal de producción de parasitología. Epi-2.....	78
Anexo H. Informe semanal de producción laboratorio de parasitología. Epi-10.....	79
Anexo I. Control de rendimiento del laboratorio. Epi-26.....	80

1. Acrónimos, siglas y abreviaturas

Acrónimo, Sigla y Abreviaturas	Significado
ACS	Grado Reactivo Analítico
BID	Banco Interamericano de Desarrollo
CECOVEZ	Centro de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores y Zoonosis
DAS	Dirección de Área de Salud (para el Distrito Nacional)
DIGEPI	Dirección General de Epidemiología
DMS	Direcciones Municipales de Salud
DNRT	Dirección de Normas y Reglamentos Técnicos
DPS	Direcciones Provinciales de Salud
EAS	Estadios Asexuados Sanguíneos
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético.
ESS	Estadios Sexuados Sanguíneos
IAES	Índice Anual de Exámenes Sanguíneos
ILP	Índice de Láminas Positivas
IPA	Índice Parasitario Anual
IREM	Iniciativa Regional de Eliminación de la Malaria
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MISPAS	Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OPS	Organización Panamericana de la Salud.
PDR	Prueba de Diagnóstico Rápido.
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SVEM	Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Malaria
SV-ETV	Sub-Sistema de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Vectores
WHO	World Health Organization
µl	Microlitro

2. Glosario

Anópheles: mosquito vector que transmite la malaria.

Anticoagulante: sustancia que impide la coagulación de la sangre. Se conocen distintos anticoagulantes que se definen según su modo de acción.

Anticuerpo: proteínas pertenecientes al grupo de las gamma globulinas o inmunoglobulinas, constituidas por la asociación de cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí mediante puentes disulfuro, dos cadenas se denominan pesadas y las otras dos ligeras. A su vez cada una de las cadenas pesadas y ligeras incluye una región variable (cuya secuencia de aminoácidos es peculiar de cada anticuerpo) y una región constante (con la misma secuencia en todos los anticuerpos)

Antígeno: sustancia que da lugar a reacciones inmunitarias. Contrario al anticuerpo.

Aseguramiento de la Calidad: conjunto de acciones planificadas y sistemáticas que son necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto satisfará los requisitos de calidad dados.

Búsqueda activa: estrategia de detección de casos motivada por iniciativa del personal de salud, promotor o voluntario, para ir de casa en casa en búsqueda de febriles donde se les toma una gota gruesa o se realiza una prueba rápida de malaria.

Búsqueda pasiva: estrategia de detección de casos en que la gota gruesa o prueba rápida es realizada a personas que acuden, por iniciativa propia, a los servicios de salud o a los Puestos Comunitarios de Notificación, por sentirse enfermas.

Calidad: aplicado a la atención en salud, hace referencia a la capacidad que con distinto grado puede tener una organización o un acto concreto de asistencia sanitaria para satisfacer las necesidades de los consumidores de servicios de salud, cumpliendo con la normativa existente.

Confidencialidad: grado de seguridad que tiene un establecimiento de salud para asegurar que las informaciones de los usuarios no sean divulgadas.

Control de calidad: conjunto de acciones que se aplican durante la ejecución de cada proceso para asegurar que los resultados, productos o servicios pueden ser entregados.

Endemia o Endemicidad Malárica: presencia más o menos continua de casos de malaria en un área determinada o en todo el territorio nacional.

Especies: organismos del mismo género que tienen características similares.

Esporozoíto: forma de los plasmodios infectantes para el ser humano. Surge de la reproducción sexual de los gametocitos y se aloja en las glándulas salivales del mosquito, siendo inyectadas durante la picadura de este a un ser humano o animal.

Esquizonte: una forma del desarrollo del parásito producto de su reproducción asexual que contiene muchos 3 o más merozoitos en su interior, por lo que adquiere forma de roseta o margarita a la observación microscópica.

Evaluación Externa: sistema de comparación retrospectivo, periódico y objetivo de los resultados de diferentes laboratorios por medio de encuestas organizadas por un ente externo independiente.

Evaluación Indirecta del Desempeño (revisión cruzada): evaluación de la calidad de las láminas producto del diagnóstico rutinario que se trata de evaluar el 100% de las muestras positivas y el 10% de las muestras negativas.

Frotis o extendido fino: película fina de sangre que se realiza sobre un portaobjeto para mirar al microscopio que está compuesto de cabeza, cuerpo y cola.

Gametocitos: forma sexuada de los plasmodios que son infectantes para el mosquito, en cuyo estómago se aparean y forman un huevo o cigoto que da lugar a los esporozoítos.

Género: categoría de organismos.

Gota gruesa: prueba de laboratorio que constituye el estándar de referencia para el diagnóstico de la malaria. Consiste en el examen microscópico de un extendido espeso de sangre en un portaobjeto, generalmente realizado a partir de sangre tomada por punción capilar.

Habilitación: proceso mediante el cual, el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, en su rol de autoridad sanitaria competente, reconoce y autoriza a través de una inspección que un establecimiento de salud reúne los requisitos y cumple con las normas establecidas para implementar los servicios que se propone ofertar. Es un proceso obligatorio y continuo, según la Ley General de Salud 42-01.

Hemoglobina: parte que se encuentra en el interior de los glóbulos rojos que transporta el oxígeno.

Malaria: enfermedad febril infecciosa, producida por protozoarios del género Plasmodium que es transmitida por la picadura de mosquitos infectados del género Anopheles. La enfermedad se caracteriza por escalofríos, fiebre y sudoración. También se conoce como Paludismo.

Muestra del paciente: sangre capilar o venosa obtenida directamente del paciente, utilizada con fines diagnósticos.

Norma: documento consensuado y aprobado por un organismo reconocido, que establece, para usos comunes y repetidos, reglas, criterios o características, para las actividades, o sus resultados, que procura la obtención de un nivel óptimo de ordenamiento en un contexto determinado.

Parásito: organismo que se beneficia de otro causándole daño.

Plasmodium: género de protozoarios que comprende numerosas especies de parásitos de los glóbulos rojos del hombre y de diversos vertebrados. Tienen un alto grado de especialización parasitaria y su ciclo evolutivo es muy complejo. Son los agentes etiológicos de la malaria o paludismo.

Procedimiento: pasos específicos para llevar a cabo una actividad, en orden secuencial.

Trazabilidad: capacidad para reconstruir el historial de la utilización, o la localización de un donante, paciente o de una actividad mediante una identificación registrada.

Vector: un vector es un ser vivo que funge como transportador viviente y transmisor del agente causal de una enfermedad. Para efectos de la malaria, se refiere al mosquito hembra de género Anópheles capaz de transmitir el agente causal de la malaria (los plasmodios) a través de su picadura.

Vigilancia Epidemiológica: observación sistemática y continua del comportamiento y tendencias de la endemia malárica y de los factores epidemiológicos que determinan y/o condicionan su transmisión y características. Este proceso permite reunir información para detectar cambios que puedan ocurrir por la alteración de factores condicionantes, con el fin de recomendar y aplicar oportunamente medidas eficientes y eficaces que lleven a la prevención y el control de la enfermedad.

3. Presentación

El Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de la República Dominicana, como institución rectora de la salud y responsable de que el sector salud cuente con todos los procesos técnicos estandarizados y normatizados, para garantizar la calidad y el diagnóstico oportuno de la Malaria, ha tenido la necesidad de elaborar el **Manual para el Diagnóstico Parasitológico de la Malaria**.

El presente manual establece los principios, lineamientos y estatutos que guiarán al sector salud a partir de este momento registrar en materia de diagnóstico parasitológico en los diferentes establecimientos y servicios que deben cumplir los diferentes centros de salud, laboratorios clínicos y laboratorio nacional de referencia de malaria, con la finalidad de asegurar un estándar de calidad en el diagnóstico oportuno de los casos de malaria en el país.

Este fue elaborado con la iniciativa del Centro de Prevención y Control de Enfermedades Transmitida por Vectores y Zoonosis (CECOVEZ), con apoyo del equipo técnico de socios estratégicos compuesto por la Iniciativa para la Eliminación de la Malaria en Mesoamérica y el Caribe (IREM), y bajo los lineamientos establecidos por la Dirección de Normas, Guías y Protocolos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.



Dr. Daniel Enrique de Jesús Rivera Reyes

Ministro de Salud Pública y Asistencia Social

3. Resolución Ministerial



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

Resolución Núm. 0034-2022.

Que establece la puesta en vigencia del Manual para el Diagnóstico Parasitológico de la Malaria.

El **Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social** (MISPAS), Institución Estatal organizada de acuerdo con la Ley Orgánica de la Administración Pública Núm.247-12, G.O.Núm.10691, del catorce (14) de agosto del año dos mil doce (2012) y la ley General de Salud Núm.42-01, de fecha ocho (8) de marzo del año dos mil uno (2001), debidamente provista de su Registro Nacional de Contribuyente (RNC) Núm. 401007398, con domicilio y asiento social principal en la avenida Héctor Homero Hernández Vargas, esquina avenida Tiradentes, ensanche la Fe, debidamente representado por el Ministro **Dr. Daniel Enrique De Jesús Rivera Reyes**, dominicano, mayor de edad, casado, titular de la cédula de identidad y electoral Núm. 031-0096377-0, médico de profesión, con domicilio y residencia en esta ciudad de Santo Domingo, Distrito Nacional.

Considerando (1): Que la rectoría del Sistema Nacional de Salud está a cargo del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y como tal este desarrollará los cambios y transformaciones que requiera el sistema para su continua adecuación a las situaciones y procesos que se desarrollen en el interior y en el exterior del sector salud, según lo establecido en el artículo 8 de la Ley General de Salud Núm. 42-01.

Considerando (2): Que los ministros de Estado podrán dictar actos administrativos sobre los servicios a su cargo, siempre que no colidan con la Constitución, las Leyes y los Reglamentos, según lo establece la Ley Orgánica De La Administración Pública Núm. 247-12.

Considerando (3): Que el Ministerio de Salud Pública, a través de su órgano técnico el Centro de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores y Zoonosis (CECOVEZ) es responsable de la planificación, normalización y la coordinación de las acciones necesarias para la prevención y el control de las enfermedades tropicales en todo el territorio nacional, incluyendo la malaria.

Pág.1

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

Considerando (4): Que la malaria es una de las enfermedades tropicales de más importancia a nivel global, en la región de las Américas y en la isla Española, que compartimos la República Dominicana y la República de Haití.

Considerando (5): Que una de las estrategias más importantes para la prevención y el control de la malaria es la promoción y aseguramiento de un diagnóstico oportuno mediante el uso de herramientas confiables y el acceso a tratamiento oportuno con medicamentos antimaláricos de reconocida eficacia.

Considerando (6): Que es fundamental dotar al personal de laboratorios de las herramientas técnicas para ofertar una atención integral y de calidad a los usuarios de dichos servicios acorde con el modelo asumido por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en los diferentes niveles de atención, mediante los ejes de promoción, prevención, detección, atención, monitoreo, registro y referimiento.

Vista: Constitución de la República Dominicana, proclamada el 13 de junio de 2015.

Vista: La Ley Orgánica de la Administración Pública, Núm. 247-12. G. O. Núm. 10691 del 14 de agosto de 2012.

Vista: La Ley General de Salud Núm. 42-01 del 8 de marzo del 2001 y sus reglamentos de aplicación.

Vista: La Ley que crea el Sistema Dominicano de Seguridad Social, Núm. 87-01 de fecha 8 de mayo del 2001 y sus reglamentos de aplicación.

Vista: La Ley Núm. 110 del 4 de enero de 1964, que crea el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria.

Visto: El Decreto Núm. 350-04, Que aprueba el Reglamento para la Habilitación y Funcionamiento de los Laboratorios Clínicos y de Salud Pública.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

Visto: La Resolución Núm. 000068, de fecha 17/12/2021, que modifica la estructura organizativa del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

Visto: La Guía para el Diagnóstico, Manejo y Prevención de la Malaria, de septiembre del 2011.

En virtud de las atribuciones que me confiere la Ley General de Salud dicto la siguiente:

RESOLUCIÓN

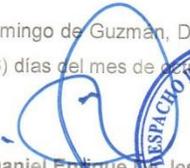
PRIMERO: Se establece la puesta en vigencia de la tercera edición del Manual para el Diagnóstico Parasitológico de la Malaria, que deroga la Guía para el diagnóstico, Manejo y Prevención de la Malaria, así como cualquier otra versión anterior, para ser utilizado por todos los servicios y establecimientos del Sistema Nacional de Salud en lo que compete a esta enfermedad.

SEGUNDO: Se instruye a todos los establecimientos de salud públicos y privados del país, para la aplicación del Manual para el Diagnóstico Parasitológico de la Malaria.

TERCERO: El Centro de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores y Zoonosis (CECOVEZ), a través del Programa Nacional de Control de la Malaria, es la instancia responsable de dar seguimiento a la aplicación de este manual.

CUARTO: Se instruye a la Oficina de Acceso a la Información a publicar en el portal web institucional el contenido de la presente resolución.

En la ciudad de Santo Domingo de Guzmán, Distrito Nacional, capital de la República Dominicana, a los seis (06) días del mes de octubre del año dos mil veinte dos (2022).


Dr. Daniel Enrique de Jesús Rivera Reyes
Ministro de Salud Pública y Asistencia Social



4. Introducción

La Malaria o Paludismo es una enfermedad tropical con alta prevalencia a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que en el 2019 ocurrieron 229 millones de casos de malaria en todo el mundo (intervalo de confianza del 95% [IC]: 203-262 millones), en comparación con 239 millones de casos en 2010 (IC 95%: 219-285 millones) y 217 millones de casos en 2016 (IC 95%: 200-259 millones). Aunque hubo un estimado de 20 millones menos de casos de malaria en 2017 que en 2010, los datos para el período 2015-2017 ponen de manifiesto que no se lograron avances significativos en la reducción de los casos de malaria en este período (WHO, 2020).

La mayoría de los casos de malaria en 2019 fueron en la Región de África (215 millones o 94%), seguidos por la Región de Asia Sudoriental de la OMS (3%) y la Región del Mediterráneo Oriental de la OMS (1%) y 2% en la Región de las Américas.

En la Región de las Américas aproximadamente 139 millones de personas en 18 países corren riesgo de contraer malaria, la mayoría (casi el 75%) es causado por *P. vivax*. En 2019, la región notificó 815 543 casos de malaria, una y 197 muertes (WHO, 2020).

En relación con la mortalidad, hubo un estimado de 409 000 muertes por malaria en todo el mundo, en comparación con 451 000 muertes estimadas en 2016 y 607 000 en 2010. Los niños menores de 5 años son el grupo más vulnerable afectado por la malaria. La Región de África concentró el 94% de todas las muertes y en Las Américas se reportaron 551 dura durante el año 2019.

A nivel global se han reorientado las metas del Programa Mundial de Malaria hacia un mundo sin malaria ocasionando que al interior de los países se realicen intervenciones para lograr este objetivo donde el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno de las infecciones es un componente relevante (OMS, 2015).

El diagnóstico inicia con la sospecha clínica de la enfermedad y es confirmado con el diagnóstico parasitológico mediante la realización de pruebas de laboratorio, básicamente, mediante el examen microscópico de una gota gruesa o la realización de una prueba de diagnóstico rápido (PDR). El diagnóstico microscópico es el principal método de diagnóstico (“Gold Standard”) ya que permite visualizar los parásitos los cuales se alojan dentro los glóbulos rojos de la sangre (WHO, 2010). Las Pruebas de Diagnóstico Rápido (PDR) son un importante componente en la estrategia de diagnóstico ya que permite confirmar la presencia de parásitos en circunstancias donde se requiere conocer el diagnóstico en corto periodo de tiempo.

La malaria es endémica en la República Dominicana, donde por largo tiempo según las características demográficas, la enfermedad había mostrado una prevalencia predominantemente rural, vinculada a la pobreza y las condiciones inadecuadas de las viviendas, fenómenos migratorios y actividades laborales.

No obstante, desde finales del año 2014, la malaria ha venido mostrando un predominio eminentemente urbano; registrándose la mayoría de los casos en zonas urbanas donde existen condiciones favorables para la reproducción del mosquito vector.

En el año 2019 a través del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) se reportó 1314, registrándose en estos focos 1241 casos, lo que representa 94%. La especie predominante es Plasmodium Falciparum.

No obstante, aunque el programa de malaria ha logrado mantener un control exitoso de la enfermedad, manteniendo tasas de incidencia bajas en los últimos años, evidenciado por el mayor número de municipios libres de transmisión, la malaria sigue siendo un problema importante debido a su capacidad de generar brotes, causar casos graves y muertes, sobre todo es aquellos casos donde la sospecha clínica es tardía y el diagnóstico parasitológico no es oportuno, además del potencial impacto que esta tiene en el turismo y la economía dominicana.

El primer pilar de la estrategia mundial de eliminación de malaria es lograr el acceso universal a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la malaria (OMS, 2015). Donde el diagnóstico es fundamental para orientar un tratamiento adecuado a los pacientes y obtener la información para la vigilancia de la enfermedad.

La malaria es una enfermedad de notificación obligatoria cuyo diagnóstico debe realizarse en todos los centros de salud de los diferentes niveles de atención, sin importar que los mismos sean públicos o privados, de acuerdo con lo expresado en la Resolución Ministerial 00005, del 05 de mayo 2006, sobre el reporte obligatorio y oportuno por parte de todo el sistema nacional de salud de diagnósticos probables de enfermedades o eventos priorizados.

Por lo tanto, este manual es una contribución a la estandarización de las normas y procedimientos para los laboratorios que realizan el diagnóstico de la malaria, enmarcado dentro del proceso de reforma del sector salud, coherente y complementario a la Guía para el Diagnóstico, Manejo y Prevención de la Malaria, fundamentado en las Normas Nacionales de Calidad para Laboratorios de Salud, las Normas Nacionales de Bioseguridad y las Normas para el Manejo de Sustancias Infecciosas y contemplando los aspectos de una gerencia moderna y un eficiente manejo técnico, de acuerdo a lineamientos nacionales e internacionales en lo referente a los laboratorios clínicos y de salud pública.

Este documento es una herramienta técnica que aportará importantes beneficios para el diagnóstico de malaria en los pacientes que acuden a nuestros servicios de salud y/o que son detectados a nivel comunitario, contribuyendo así a un diagnóstico de laboratorio confiable y de calidad, lo cual garantizará un manejo oportuno y apropiado de las personas que contraigan la enfermedad; con su consecuente efecto en la disminución de la morbilidad, las complicaciones y mortalidad asociadas a este trastorno; promoviendo así una República Dominicana más saludable.

5. Objetivo

5.1. Objetivo General

Establecer los lineamientos técnicos para realizar el diagnóstico parasitológico de malaria en los laboratorios clínicos, con el fin de estandarizar procesos y procedimientos en todo el territorio nacional.

5.2. Objetivos Específicos

- Definir los procedimientos para el diagnóstico de la malaria, de modo que el personal de la Red de Laboratorios cuente con la normativa actualizada de gestión de buenas prácticas de laboratorio y con los procedimientos estandarizados que permitan realizar un diagnóstico microscópico o por pruebas rápidas, precisos y oportunos, a fin de contribuir al manejo apropiado de los casos.
- Dar a conocer la utilidad de los métodos de diagnóstico por el laboratorio para malaria en escenarios de baja transmisión, con el fin de apoyar la eliminación de la malaria en República Dominicana.
- Favorecer a la emisión correcta de resultados del diagnóstico parasitológico de malaria para apoyar la adecuada atención y seguimiento del paciente con malaria y ser una fuente de información confiable para el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de la Malaria (SVEM).

6. Ámbito de aplicación

Este manual ha sido elaborado para ser aplicado en todos los laboratorios clínicos, públicos y privados, centros y servicios de salud con diagnóstico de malaria, laboratorios referenciales del nivel intermedio y nacional del sistema de salud de la República Dominicana.

7. Análisis del marco legal

7.1. Antecedentes

Las normas técnicas o de calidad son directrices que indican el comportamiento a seguir por las instituciones, las cuales permiten generar beneficios éticos, sociales y económicos, solucionar situaciones específicas y dar respuesta a requerimientos determinados en las áreas sociales, salud, protección al medioambiente, riesgos laborales, gestión administrativa y aseguramiento de la calidad entre otros aspectos (MISPAS, 2010).

El proceso de reforma y modernización del sector salud puso de manifiesto la necesidad de normalizar todas las actividades que se desarrollan en el área de la salud incluyendo a los laboratorios clínicos públicos y privados del sistema de salud del país.

En ese sentido, la formulación de un manual de diagnóstico parasitológico de la malaria para la red de laboratorios, como complemento a las normas nacionales referentes al laboratorio clínico, resume los requerimientos normativos más importantes, detalla las acciones y procesos específicos vinculados con el diagnóstico de laboratorio en malaria, y persigue al mismo tiempo la estandarización, simplificación, documentación, difusión e implementación de los procesos, así como la especificación del lenguaje para evitar errores de interpretación, contribuyendo a elevar los niveles de eficiencia en el diagnóstico.

7.2. Marco legal y Normativo

- a) Constitución de la República Dominicana proclamada el año 2015.
- b) Ley No. 42-01, General de Salud del 8 de marzo del año 2001.
- c) Ley No. 87-01 que crea el Sistema Dominicano de Seguridad Social del 9 de mayo del 2001.
- d) Ley No.123-15 del Servicio Nacional de Salud del 16 de julio del 2015.
- e) Ley No. 1-12 de la Estrategia Nacional de Desarrollo del 25 de enero del 2012.
- f) Ley No. 247-12, Orgánica de la Administración Pública del 14 de agosto de 2012.
- g) Ley No. 110, que crea el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria, del 4 de enero de 1964.
- h) Decreto No. 64-08 que establece el Código de Ética de los Bioanalistas, del 4 de febrero del 2008.
- i) Decreto No. 1955, Reglamento sobre Erradicación de la Malaria, del 10 de septiembre de 1956.
- j) Resolución 000004 del 2 de marzo del 2020, que declara la actualización de enfermedades y eventos de notificación obligatoria del sistema nacional de salud y modifica la resolución No. 00004-13, de fecha 7 de enero del año 2013, sobre el reporte obligatorio y oportuno por parte de todo el sistema nacional de salud de enfermedades o eventos priorizados.
- k) Manual de Procedimientos de Vigilancia Entomológica y Manejo Integrado de Vectores, abril 2018.
- l) Resolución No. 000029 del 14 de diciembre del 2016 sobre el manejo de desechos y residuos, prevención y control de infecciones vinculadas a la salud, y a la protección de la salud de los trabajadores en los establecimientos y servicios de salud.
- m) Resolución No. 000068 del 17 de diciembre del 2021 que aprueba la estructura organizativa de del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- n) Disposición No. 000004 del 13 de octubre del 2016 que aprueba la estructura organizativa y funciones de las expresiones territoriales desconcentradas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- o) Guía técnica de bioseguridad en laboratorio clínico, puesta en vigencia mediante Resolución No. 000030 del 19 de octubre del 2015.
- p) Guía de Diagnóstico, Manejo y Prevención de la Malaria, puesta en vigencia por medio de Disposición No. 0000032 del 28 de septiembre 2011, que establece la puesta en vigencia y pone a disposición del personal médico y paramédico de todos los establecimientos de salud públicos y privados del país, la guía para el diagnóstico, manejo y prevención de la malaria.

- q) Manual de procedimientos para la vigilancia epidemiológica de la Malaria, puesto en vigencia por medio de Resolución No. 0000037, de noviembre del 2011, que establece la puesta en vigencia y pone a disposición de las gerencias y técnicos de las expresiones desconcentradas del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, de los técnicos que participan de la vigilancia y control epidemiológico, así como del personal médico y paramédico de todos los establecimientos de salud públicos y privados del país, el manual de procedimientos para la vigilancia epidemiológica de la malaria.
- r) NORDOM 577 del 2003. Normas Nacionales de bioseguridad para laboratorios directrices y requisitos generales para la Bioseguridad de Laboratorios.
- s) Disposición No. 0000001 del 31 enero del 2011, que pone en vigencia las Normas Nacionales para la calidad de los laboratorios clínicos de salud.

8. Política de operación y lineamientos técnicos

El diagnóstico parasitológico de malaria adapta y adopta los lineamientos técnicos establecidos por la OMS/OPS referentes a los procedimientos, técnicas de diagnóstico, detección parasitaria, identificación de especie, recuento e informe.

Una de las principales publicaciones de la OMS es Basic malaria microscopy Part I. Learner's guide y los procedimientos operativos estandarizados del diagnóstico de malaria de la OMS en el siguiente enlace: <https://iris.wpro.who.int/handle/10665.1/14214> (WHO, 2010).

Adicionalmente, se integra el uso de los diferentes métodos de diagnóstico de malaria, de acuerdo con los lineamientos de la OMS en el documento Meeting report of the Evidence Review Group on malaria diagnosis in low transmission settings (WHO, 2013).

El diagnóstico universal para malaria sigue siendo un reto para el país y requiere la participación de más actores del sector salud para cerrar esta brecha.

9. Procedimientos

Para contextualizar el diagnóstico de la malaria, es indicado considerados los aspectos básicos sobre la definición de la enfermedad y el ciclo de vida del parásito que la ocasiona.

9.1. La Malaria

La Malaria o Paludismo es una enfermedad tropical producida por cuatro especies de parásitos protozoarios del género Plasmodium, y es transmitida de una persona a otra a través de la picadura de la hembra del mosquito Anopheles. En orden de prevalencia estas especies son: P. falciparum, P. vivax, P. ovale y P. malariae. De estos parásitos el P. falciparum es el que está asociado a casos graves y muertes por malaria y es la única especie presente en la República Dominicana, no obstante, cada año en el país se registra un considerable número de casos de malaria por P. vivax importados de otros países.

9.2. Ciclo de vida

La enfermedad se inicia con la picadura de la hembra de un mosquito infectado que inocula los esporozoítos del Plasmodium presentes en su saliva. Estos esporozoítos llegan al torrente sanguíneo de la persona y de allí en un promedio de 30 a 40 minutos llegan al hígado donde invaden los hepatocitos. En ese momento se inicia el ciclo exoeritrocítico. En el interior de las células hepáticas, los parásitos se multiplican profusamente constituyéndose en esquizontes hepáticos, que aumentan de tamaño debido a la multiplicación de los parásitos, hasta hacer estallar el esquizonte y el hepatocito liberándose un nuevo estadio del Plasmodium, denominado merozoito. Los merozoitos se diseminan en el torrente sanguíneo, donde invaden los glóbulos rojos.

Dentro de los glóbulos rojos los merozoitos se alimentan de la parte proteica de la hemoglobina, crecen, se redondean y se transforman en trofozoítos, estos se multiplican y forman esquizontes eritrocitos, que aumentan de tamaño y luego estallan y liberan nuevos merozoitos, los cuales invaden nuevos glóbulos rojos. Los trofozoítos y esquizontes son las formas asexuales del parásito. No obstante, algunos merozoitos por circunstancias aún desconocidas no se transforman en trofozoítos, sino que se convierten gametocitos, que son la fase sexual del Plasmodium, ya que se diferencian en gametocitos masculinos y femeninos.

Los gametocitos son la forma infectante para el mosquito. Cuando un nuevo mosquito pica en esta fase al enfermo, va a adquirir los gametocitos circulantes, los cuales en el interior del mosquito experimentan una serie de transformaciones hasta llegar a esporozoítos infectantes, los cuales se alojan en las glándulas salivales del mosquito. Al estar en las glándulas salivales, el mosquito estará listo para iniciar un nuevo ciclo de transmisión al picar a una nueva persona.

En sentido general, el ciclo biológico comprende 2 fases, una fase sexual y otra asexual.

9.2.1. Fase sexual

Esta fase inicia cuando una hembra del mosquito Anopheles toma sangre de una persona infectada y durante la ingestión de la sangre logra succionar la forma del parasito llamada gametocitos, tanto el gametocito macho (microgametocito) como el hembra (macrogametocito). Dentro del estómago del mosquito el microgametocito se exflagela, y cada microgameto fecundo al macrogameto que forma el cigoto que luego se transforma en ooquinete el cual viaja a través de la pared del estómago del mosquito y forma ooquistes. En estos ooquistes los parásitos de malaria se multiplican, hasta que el ooquiste contiene miles de nuevos parásitos, los esporozoítos, los cuales se alojan dentro de las glándulas salivales del mosquito y desde aquí son inoculados a otra persona mediante una nueva picadura. Este ciclo varía según la especie de Plasmodium, pero normalmente dura entre 7 y 14 días.

9.2.2. Fase asexual

Esta incluye una fase hepática y una fase eritrocítica.

9.2.2.1. Fase hepática

Esta fase tiene lugar horas después de que el mosquito *Anopheles* infectado inocula los esporozoítos a una persona mediante una picadura. Estos esporozoítos rápidamente se dirigen al hígado donde invaden las células hepáticas. Dentro de las células hepáticas, el esporozoíto se desarrolla hasta formar el esquizonte hepático que contiene dentro de él numerosas nuevas formas del parásito, los merozoítos. Este esquizonte aumenta de tamaño por replicación del núcleo y finalmente el esquizonte madura liberando los merozoítos, los cuales pasan al torrente sanguíneo.

En los casos de malaria por *P. vivax* y *P. ovale*, algunas formas del parásito se desarrollan lentamente en el hígado permaneciendo en forma latente por varios meses los cuales se denominan hipnozoítos. Estos al activarse tardíamente en el hígado y salir a la circulación dan origen a las recaídas de malaria.

9.2.2.2. Fase eritrocítica

Esta fase inicia cuando los merozoítos en el torrente sanguíneo invaden los glóbulos rojos. En los glóbulos rojos los parásitos de malaria toman los nutrientes necesarios para su supervivencia. Dentro de los glóbulos rojos los merozoítos inician el proceso de crecimiento hasta formar trofozoítos y de estos dividen su núcleo y forman los esquizontes eritrocitos, que contienen numerosos merozoítos y estos últimos se liberan invadiendo otros glóbulos rojos. Este proceso se denomina esquizogonia.

Durante esta fase eritrocítica, algunos merozoítos que están programados genéticamente se transforman en gametocitos (fase sexual). Este proceso es aún desconocido, pero es esta fase es la que hace posible la transmisión al vector (OPS, 1988).

9.3. Bases del diagnóstico parasitológico de la malaria

De manera rutinaria el diagnóstico de la malaria está basado en la confirmación de la presencia de los parásitos en la sangre de los enfermos, mediante el examen microscópico de una gota gruesa y/o la detección de los antígenos parasitarios mediante la prueba de diagnóstico rápido (PDR).

El diagnóstico de laboratorio a través del examen microscópico es el método de elección o estándar de referencia para el diagnóstico de malaria.

Este método ofrece varias ventajas, como son:

- Bajo costo
- Altamente sensible si la microscopía es buena (microscopistas competentes, reactivos equipos de buena calidad)

- Permite la diferenciación entre las distintas especies y estado de los parásitos
- Permite la determinación de la densidad parasitaria
- Permite evaluar la eficacia de los antimaláricos (SNEM, 2008).

9.3.1. Diagnóstico microscópico

Los laboratorios de la red para el diagnóstico de la malaria de acuerdo con su nivel deben contar con equipos y materiales para el desarrollo de sus funciones y asegurar un diagnóstico de calidad.

9.3.1.1. Instrucciones para la limpieza de las láminas portaobjetos

Algunas láminas portaobjeto vienen previamente lavadas, sin embargo, en ocasiones es posible que tengan una fina película de grasa. En estos casos el analista o microscopista debe asegurarse que las láminas se encuentren limpias, antes de utilizarlas por lo que debe lavarlas. El procedimiento de lavado debe seguir los principios correspondientes que se encuentran en la guía técnica de bioseguridad en laboratorios clínicos (Dirección de Laboratorios Clínicos; Ministerios de Salud Pública y Asistencia Social, 2016)

Materiales:

- 2 recipientes grandes de plástico uno de los cuales debe tener tapa
- Alcohol antiséptico
- Cajas para almacenar láminas (lamineros) o cajas originales de las láminas portaobjeto
- Esponja suave
- Guantes
- Jabón neutro líquido para el lavado de material de laboratorio
- Papel que no desprenda pelusa
- Paquete con desecante (sílica gel)
- Tela que no desprenda hilaza

Procedimiento:

- En solución jabonosa al 3% (jabón neutro para lavado de material de laboratorio) se sumergen las láminas sueltas una a una en un recipiente plástico con suficiente capacidad por un tiempo de por lo menos por 4 horas.
- Tomando las láminas por los bordes se lavan una a una utilizando guantes y se frota por los dos lados con una esponja suave.
- El agua jabonosa se retira con abundante agua. Posteriormente, se sumergen las láminas en alcohol antiséptico en un recipiente boca ancha con tapa. Se deja por 2 horas. Manténgalo alejado de la luz solar directa.
- Se seca lámina por lámina, de manera firme con una tela que no desprenda hilaza.
- Se envuelven las láminas en papel bond en paquetes de 10 láminas y se empaquetan en la caja original o caja de cartón colocando un paquete de sílica gel. También se pueden organizar en la caja para el almacenamiento de láminas colocando en

la caja el paquete de sílica gel. Es indicado marcar la caja con la fecha del procedimiento, número de láminas limpias, iniciales o nombre de quien lavó las láminas. Se almacena a temperatura ambiente y en ligar seco (Gutiérrez, 2003) (Mejía, 2012).

9.3.1.1.1. Registro de los datos

Previo al proceso de obtención de la muestra hemática, se debe registrar los datos generales del paciente, con letras claras y legibles, utilizando los instrumentos diseñados para estos fines, denominado registros Mal-0-01, Mal-0-03, Mal 0-04 (anexos A, B y C). En el Mal-00-1 se consignan los datos de las muestras de diagnóstico del nivel comunitario por búsqueda activa, en el Mal-002 la solicitud de laboratorio para la toma de muestras y el Mal 0-04 el resultado de la lectura de las muestras de gota gruesa o PDR tomadas por búsqueda pasiva. El formulario Mal-0-03 será llenado cuando el diagnóstico del paciente sea positivo para malaria a la par del llenado del formulario único de notificación y subido a la plataforma del SINAVE.

Desde el momento de la toma de muestra hasta la entrega del resultado no puede pasar más de 24 horas.

Los datos consignados en los registros deben ser precisos de tal forma que la información permita localizar posteriormente al paciente, para poder realizar la investigación epidemiológica y el seguimiento del caso de malaria.

9.3.1.2. Toma de muestra

Materiales:

- Algodón absorbente
- Caja para almacenar láminas
- Fundas plásticas con cierre hermético
- Guantes no estériles libres de polvo
- Lámina extensora
- Láminas nuevas limpias y desengrasadas
- Lancetas estériles
- Lápiz de grafito
- Papel filtro Whatman (para pacientes positivo)
- Paqueticos de desecante (sílica gel)
- Plantilla para elaborar la gota gruesa y el extendido
- Registros

Reactivos:

- Alcohol antiséptico 70%

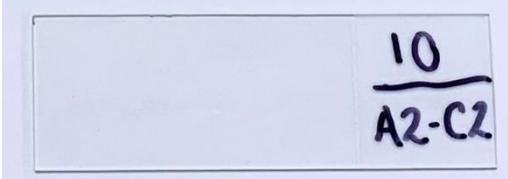
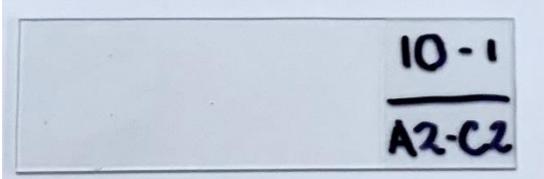
La muestra debe ser identificada en el borde esmerilado de la lámina utilizando un lápiz de grafito con el código asignado al paciente. La muestra de preferencia es sangre capilar debido a su fácil obtención, sin embargo, también puede utilizarse sangre total tomada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). En el caso de usar sangre venosa con anticoagulante la gota gruesa debe prepararse en la primera hora de tomada la muestra, debido a que el anticoagulante puede distorsionar la morfología del parásito. De igual modo, se debe tener precaución durante el tiempo de secado protegiendo la muestra del polvo e insectos (SNEM, 2008) (National Parasitology Reference Laboratory).

Para la toma de muestra del diagnóstico de malaria, el paciente no necesita preparación previa, sin embargo, debe informársele sobre el procedimiento y obtener su consentimiento verbal.

La gota gruesa es una muestra concentrada para el diagnóstico de malaria y está conformada por numerosas capas de sangre. Durante la coloración, los glóbulos rojos sufren la deshemoglobinización permitiendo la liberación del parásito con su consecuente visualización. El extendido fino, es una delgada capa de células sanguíneas que al ser fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa, permite la observación de las características morfológicas de los parásitos presentes en los glóbulos rojos.

- Teniendo presente las medidas de bioseguridad se realiza la toma de muestra siguiendo el siguiente procedimiento:

a. Se alista el material de la toma de muestra	 <p>Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, materiales para toma de muestra)</p>
--	--

<p>b. Se identifican las láminas con lápiz de grafito o carbón en el área esmerilada. De no tener este tipo de lámina, se utiliza un marcador de punta fina y se identifica en un extremo de esta. Se escribe el número consecutivo de la muestra y el código del puesto. En caso de muestra de seguimiento parasitológico se adicionará el número del seguimiento (1, 2, 3, 7, 14, 21, 28).</p>	<p>Ejemplo 1, muestra diagnóstica: Número de la muestra: 10 Código del establecimiento de salud o colaborador comunitario: A2-C2 – Dirección de Área Salud 2, Centro de primer nivel Las Lilas.</p>  <p>Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, identificación de la lámina portaobjetos).</p> <p>Ejemplo 2, muestra de seguimiento: Número de la muestra: 10 Numero de seguimiento: 1 Código del establecimiento de salud o colaborador comunitario: A2-C2 – Dirección de Área Salud 2, Centro de primer nivel Las Lilas.</p>  <p>Fuente: Elaboración propia. (CECOVEZ, identificación de la lámina portaobjetos)</p>
--	---

<p>c. Para hacer la gota gruesa se selecciona el sitio a puncionar y se estimula la circulación con un leve masaje, luego se limpia con un algodón humedecido con alcohol antiséptico al 70% y se retira el exceso con un algodón seco.</p>	 <p>Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, desinfección del sitio de punción)</p>
<p>d. Se realiza la punción en la parte lateral del pulpejo (yema) del dedo índice o medio de la mano no dominante; en niños pequeños, se</p>	

tomará del lóbulo de la oreja, del dedo gordo del pie o del talón. También se podrá hacer con sangre venosa tomada con anticoagulante. Con una lanceta estéril, se punciona en el área seleccionada, se presiona ligeramente para que salga la primera gota de sangre que debe limpiarse con algodón seco.



Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, punción capilar)

e. Inmediatamente, se coloca una nueva gota de sangre en la parte media de la lámina que corresponde a la mitad del tamaño de la primera, esta se utilizada para hacer el extendido fino. Coloque un algodón seco en el área puncionada y pídale al paciente o a un familiar que presione por unos minutos.



Fuente: Elaboración propia. (CECOVEZ, posición de la lámina sobre el sitio de punción).

f. Inmediatamente, se coloca una nueva gota de sangre en la parte media de la lámina que corresponde a la mitad del tamaño de la primera, esta se utilizada para hacer el extendido fino. Coloque un algodón seco en el área puncionada y pídale al paciente o a un



Fuente: Elaboración propia. (CECOVEZ, posición de la lámina sobre el sitio de punción)

familiar que presione por unos minutos.

g. La sangre se coloca en un portaobjeto nuevo y limpio, se inicia elaborando el extendido fino colocando la lámina extensora a 45° ubicándola delante de la gota y se hace un movimiento hacia atrás con el fin de permitir que la sangre se extienda por capilaridad por el borde de la lámina extensora. Se desliza la extensora hacía el extremo final de la lámina.



Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, elaboración de extendido fino)

h. Posteriormente, utilizando la esquina de la lámina se coloca sobre el centro de la gota de sangre de mayor tamaño haciendo tres movimientos circulares hasta alcanzar un diámetro de 1 cm y se realizan tres movimientos circulares hacia el centro de la gota gruesa, puede terminar de homogeneizar con movimientos de vaivén.



Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, Elaboración de la gota gruesa)

i. La muestra debe dejarse secar al ambiente y protegerla de los insectos, polvo, calor y luz solar. Cuando se seque, se procede a colorear.

Algunas de las fallas más comunes en la preparación de los extendidos son las siguientes (WHO, 2010):

- a. Mala posición de la gota gruesa y el extendido
- b. Mucha sangre
- c. Poca sangre
- d. Láminas grasosas
- e. Borde irregular de la lámina usada para hacer el extendido



Fuente: (WHO, 2010)

9.3.1.3. Precoloración:

- Erlenmeyer
- Espátula
- Frascos color ámbar con tapa rosca que no dejen pasar la luz
- Mortero
- Nevera
- Pipetas de transferencia
- Pipeteador automático o Pipet Aid
- Probeta
- Vaso de precipitados (Beaker)

Reactivos:

- Agua destilada
- Cloruro de Azul de metileno para microscopía ($C_{16}H_{18}ClN_3SxH_2O$)
- Ortofosfato disódico anhidro, Na_2HPO_4
- Ortofosfato monopotásico, KH_2PO_4

Azul de metileno fosfatado:

Cloruro de azul de metileno para microscopía	1,0 g
Ortofosfato disódico anhidro, Na_2HPO_4	3,0 g
Ortofosfato monopotásico, KH_2PO_4	1,0 g

Se trituran bien los reactivos en un mortero seco hasta lograr una mezcla homogénea. Se pesa 1 g para disolver en 300 ml de agua destilada tipo I (OPS, 1988). Antes de usar se filtra la alícuota de uso (50 ml) y se almacena en frasco ámbar tapa rosca y boca ancha. La temperatura ideal de almacenamiento es 4 °C para disminuir el desarrollo de contaminación. El reactivo debe alcanzar temperatura ambiente antes de usarlo.

9.3.1.4. Coloración

Para el examen rutinario de las muestras de gota gruesa se recomienda el método de tinción de Giemsa. Este método de coloración es una mezcla de eosina y azul de metileno. La eosina tiñe la cromatina del parásito de color rojo o rosado, y el azul de metileno tiñe el citoplasma del parásito azul y los núcleos de las células blancas se tiñen de azul casi negro, dependiendo del tipo de glóbulo blanco.

La solución madre de Giemsa están disponibles comercialmente, o pueden ser preparadas a partir de los siguientes ingredientes básicos, los cuales producen resultados más constantes y se mantienen en condiciones estables aún hasta 5 años.

Preparación de la solución madre Giemsa (100 ml):

La siguiente es la formulación de la solución madre de Giemsa (OPS, 1988):

Reactivos:

Colorante de Giemsa para microscopía.....0,75 g
 Glicerina bidestilada (87%)35 ml
 Alcohol metílico, grado reactivo analítico (ACS).....65 ml

Materiales y equipos:

- Balanza de precisión
- Beaker o vaso de precipitados
- Embudo (diámetro de 10 cm)
- Frascos goteros color ámbar (50 ml)
- Frascos boca ancha color ámbar (500 ml)
- Mortero (diámetro interno de al menos 10 cm)
- Perlas de vidrio

- Probetas graduadas (50 y 100 ml)
- Papel para pesar

Reactivos:

- Alcohol metílico, grado reactivo analítico (ACS)
- Colorante de Giemsa para microscopía en polvo
- Glicerina bidestilada (87%)

Nota: Estos materiales y reactivos aplican al Laboratorio Nacional de Referencia de Malaria ubicado en el CECOVEZ, que es quien provee los reactivos preparados, listos para su uso.

Procedimiento para la preparación de la solución stock de Giemsa:

Pesar y medir las cantidades exactas descritas en la fórmula

- Se alista un frasco de vidrio ámbar con capacidad de 200 ml.
- Se coloca la cantidad de Giemsa ya pesada en un mortero y se macera.
- La glicerina se agrega poco a poco y se sigue macerando hasta observar que el colorante está homogéneo, se pasa a un frasco ámbar con perlas de vidrio de diámetro de 3 a 5 mm.
- Con metanol se enjuaga varias veces el mortero para evitar que queden restos de colorante.
- Luego se completa el volumen del metanol según indica la fórmula.
- El colorante debe ser rotulado (nombre, fecha de preparación, responsable de la preparación).
- Se deja la solución madre a entre 15 a 30 °C y se agita todos los días (2 veces al día) con movimientos de rotación por tres semanas.
- Posteriormente, se deja una semana en reposo y a temperatura ambiente para lograr su maduración, es decir que sucedan reacciones de oxidación dando lugar a colorantes secundarios que favorecen la policromía de la coloración.
- Después se filtra (papel filtro Whatman #1) la cantidad de uso necesario para una o dos semanas. No es adecuado agitar el frasco de solución madre antes de realizar este procedimiento porque los cristales del colorante quedan en suspensión (SNEM, 2008) (Mejía, 2012).
- La solución stock se mantiene en ambiente fresco, seco, protegida de la luz a una temperatura entre 15 a 30 °C.

La solución Giemsa madre a temperatura ambiental es estable por hasta por 5 años.

Aspectos importantes de la coloración de Giemsa

- El material de vidrio utilizado para la preparación del colorante debe estar limpio, seco y sin residuos de detergentes, por eso es indicado usar detergente líquido neutro.
- El frasco donde se almacena la solución madre debe ser de color oscuro, el cual debe mantenerse bien tapado y en un lugar fresco y seco lejos de la luz directa del sol para evitar la evaporación y oxidación del colorante por la alta humedad.
- Para las necesidades diarias, medir pequeñas cantidades de la solución madre en un frasco con tapa, de este modo la solución madre tiene menos posibilidad de ser contaminada.
- No añadir agua a la solución madre; incluso la cantidad más pequeña hará que la solución se precipite, provocando que pierda la potencia de tinción.
- No agitar la botella del colorante antes de su uso. Esto puede provocar que se suspendan los cristales que pudieran encontrarse en el fondo, perjudicando la coloración y que pequeñas partículas se adhieran a la muestra y/o la lámina durante el proceso de tinción, las cuales se pueden observar durante el examen microscópico.
- No devolver el colorante no utilizado al frasco que contiene la solución madre. Una vez que el colorante está fuera del frasco, este debe ser utilizado rápidamente o de lo contrario debe ser descartado (Gutiérrez, 2003) (Mejía, 2012).
- No utilizar el colorante recién preparado, dejar que madure durante un mínimo de 15 días (Gutiérrez, 2003) (Mejía, 2012).

Preparación de soluciones amortiguadoras

La solución amortiguadora para la coloración de Giemsa es la solución que se prepara para la dilución del colorante y se prepara a partir de la mezcla de dos soluciones amortiguadoras, una ácida y una alcalina, a partir de proporciones que produzcan un pH neutro (entre 7,0 y 7,2).

Materiales y equipos:

- Balanza de precisión
- Beaker o vaso de precipitados
- Embudo
- Espátula
- Frasco de vidrio tapa rosca
- Mortero (diámetro interno de al menos 10 cm)
- Papel filtro
- Papel para pesar
- Perlas de vidrio
- PH metro
- Probetas graduadas (10, 50,100 ml y 1000 ml)

Reactivos:

- Ortofosfato disódico anhidro, Na₂HPO₄
- Ortofosfato monopotásico, KH₂PO₄
- Agua destilada

Solución amortiguadora o buffer:

Ortofosfato disódico anhidro, Na ₂ HPO ₄	6 g
Ortofosfato monopotásico, KH ₂ PO ₄	5 g

Las sales se mezclan bien en un mortero y se disuelve 1 g de mezcla en un litro de agua destilada tipo I. Con las anteriores cantidades de sales se obtiene un pH aproximado de 7,2 el cual resulta adecuado tanto para la preservación celular como para lograr las tonalidades ideales en la coloración (OPS, 1988) (SNEM, 2008).

Si al verificar el pH, es necesario ajustarlo, se utiliza para acidificarlo solución correctora de ortofosfato monopotásico (KH₂PO₄), pero si lo que se requiere es alcalinizarlo se utiliza la solución correctora de ortofosfato disódico anhidro (Na₂HPO₄).

Es posible hacer el buffer a partir de una solución ácida y solución básica (Mejía, 2012).

Solución A (solución ácida)

KH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	9,2 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver la sal en una pequeña cantidad de agua, una vez disuelva la sal complete el volumen hasta completar 1000 ml. Mezcle bien y rotule.

Solución B (Solución básica o alcalina)

Na ₂ HPO ₄	9,5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver la sal en una pequeña cantidad de agua, una vez disuelva la sal complete el volumen hasta completar 1000 ml. Mezcle bien y rotule.

El pH ideal es de 7,2, sin embargo, se muestran las proporciones para obtener un pH de 7.0 o 7,2.

En la tabla 1, se presentan las proporciones de la solución A y B para obtener una solución buffer pH 7,0 o 7,2.

Tabla 1. Proporciones utilizadas para preparar 1 Litro de buffer

pH	Solución A (ácida) ml	Solución B (alcalina) ml	Agua destilada ml
7,0	39	61	900
7,2	28	72	900

Fuente: (Mejía, 2012)

Sin embargo, si después de medir el pH es necesario ajustarlo se usan las soluciones correctivas al 2% (WHO, 2010)

Solución de fosfato de potasio 2% (Solución acida):

$\text{KH}_2\text{PO}_4 (\text{H}_2\text{O})$	2 g
Agua destilada	100 ml

Para preparar esta solución, disolver el fosfato de sodio monobásico en una pequeña proporción de agua destilada. Una vez disuelta, agregar el resto del agua. Mezclar bien y guardar frasco rotulado como KH_2PO_4 al 2% en lugar frío y resguardado de la luz solar.

Solución de fosfato de sodio 2% (Solución básica o alcalina)

Na_2HPO_4	2 g
Agua destilada	100 ml

Para preparar esta solución, disolver el fosfato de sodio monobásico en una pequeña proporción de agua destilada. Una vez disuelta, agregar el resto del agua. Mezclar bien y guardar frasco rotulado como Na_2HPO_4 al 2% en lugar frío y resguardado de la luz solar.

Nota: Estos materiales y reactivos aplican al Laboratorio Nacional de Referencia de Malaria ubicado en el CECOVEZ, que es quien provee los reactivos preparados, listos para su uso.

Procedimiento de coloración

Materiales y equipos:

- Bandeja cóncava de tinción
- Frasco boca ancha con tapa rosca con capacidad de 50 ml
- Frasco gotero
- Guantes desechables
- Pipeta Pasteur plástica
- Probeta graduada
- Reloj de laboratorio
- Soporte de coloración
- Taco ranurado para el secado de láminas

Reactivos:

- Azul de metileno fosfatado
- Colorante stock de Giemsa filtrado
- Metanol
- Solución buffer pH: 7,2

Fijación del extendido fino: la fijación del extendido fino se realiza por inmersión en alcohol metílico, evitando que el alcohol haga contacto con la gota gruesa ya que el metanol fijaría la gota gruesa impidiendo su deshemoglobinización. Para ello, colocar la lámina portaobjetos en posición vertical en el bloque de secado con la gota gruesa hacia arriba y el extendido fino hacia abajo. También, puede usar una pipeta Pasteur para verter las gotas de alcohol metílico sobre el extendido fino.

- **Precoloración con azul de metileno (precoloración de Walker):** corresponde a la precoloración con azul de metileno fosfatado que se realiza a la gota gruesa (OPS, 1988) (Iannacone, 1999).

Se sirve una alícuota de aproximadamente 50 ml de azul de metileno fosfatado filtrada en un recipiente boca ancha que impida el paso de la luz a su interior y con tapa que permita introducir la lámina portaobjetos por inmersión, pero que evite la contaminación ambiental de la solución cuando no se esté utilizando. Se sumerge la gota gruesa, evitando cubrir el extendido fino.

Se introduce la gota gruesa durante 3 segundos en buffer pH: 7,2. Se conserva una alícuota de buffer para los enjuagues.

Se coloca la lámina en el soporte cóncavo de coloración con la muestra de sangre hacia el lado de la concavidad.

- **Preparación de la solución de trabajo del colorante Giemsa:** se utilizan la coloración rápida al 10% o la lenta al 3%. El método rápido es recomendado en aquellos momentos donde el diagnóstico rápido es esencial para la atención del paciente. Este es el método más común para la coloración entre 1 a 15 láminas. Es usado en laboratorios donde se requiere un rápido resultado para determinar el estado de un paciente de malaria. El método lento es usado cuando se requiere colorear un gran número de láminas (por encima de 20 láminas).

Para la solución de trabajo de Giemsa al 10% se utiliza por cada ml de buffer dos gotas de solución madre de Giemsa.

Para preparar la solución de trabajo de Giemsa al 3% se debe establecer una proporción donde dependiendo de la cantidad de muestras a colorear se determina la cantidad de solución de trabajo a preparar, por ejemplo:

Para prepara 10 muestras, se tiene en cuenta que para cada lámina se utilizan 5 ml de buffer, por lo tanto, para 10 muestras se requerirán 50 ml buffer.

Si se tiene que el volumen total de buffer es de 50 ml entonces corresponde al 100 % del volumen, pero se requiere conocer el volumen de Giemsa si la solución es al 3%. Por lo tanto:

$$\begin{array}{l} \text{Si } 50 \text{ ml } \text{-----} 100\% \\ \text{X} \text{-----} 3\% \\ \text{X} = 1, 5 \text{ ml de Giemsa.} \end{array}$$

Entonces se resta de 50 ml de buffer, los 1,5 ml de Giemsa para conocer el volumen que se debe medir de buffer; por lo tanto, el volumen de buffer requerido es 48,5 ml.

Una vez preparada la solución de trabajo, se sirve en la bandeja cóncava de coloración entre la lámina portaobjeto y la concavidad evitando la formación de burbujas.

Se lava el exceso de colorante sumergiendo suavemente la lámina en un recipiente con buffer pH: 7,2.

Colocar la lámina en el bloque de secado hasta que estas sequen.

9.3.1.5.Examen microscópico de la muestra

Antes de realizar el análisis, las muestras de sangre y las láminas deben conservarse en las condiciones adecuadas para preservar su calidad. La gota gruesa, después de coloreada, protegida del polvo y de los insectos, es estable por algunos meses.

Equipos mínimos:

- Microscopio
- Contador manual de células

Materiales:

- Papel para limpiar lentes del microscopio
- Papel absorbente para eliminar aceite de inmersión de las láminas
- Cajas para almacenar láminas

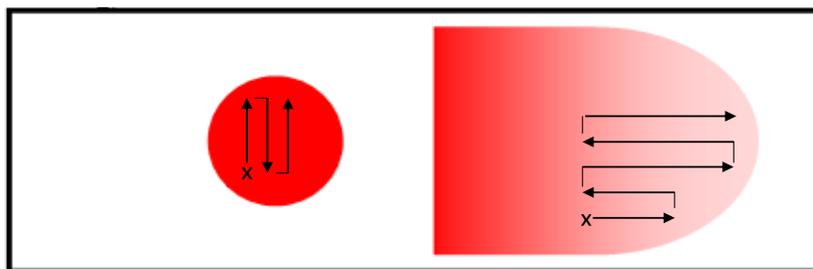
Reactivos:

- Aceite de inmersión índice de refracción 1,5.

Técnica para el examen microscópico de la gota gruesa:

1. Se coloca la lámina portaobjeto en la platina mecánica del microscopio, con la posición de gota gruesa en línea con el lente del objetivo.
2. Usando los objetivos de 10X y 40X se selecciona la parte de la muestra en la que observe buena calidad de la muestra donde se vea uniforme y con glóbulos blancos.
3. Se coloca una gota de aceite de inmersión y se gira al objetivo de 100X colocándolo sobre el área anteriormente seleccionada. Usando el botón micrométrico se observan los campos microscópicos. Se inicia la visualización por campos microscópicos que tengan entre 10-20 glóbulos blancos por campo. En la figura 1, se observa la forma cómo se examina la gota gruesa.

Figura 1. Forma de examinar la gota gruesa



Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, examen de la gota gruesa y el extendido fino)

4. El examen de rutina de una gota gruesa se hace cuidadosamente y se deben revisar 500 campos microscópicos antes de descartar la muestra como negativa.

Elementos formes de la sangre

Durante el examen de una muestra de gota gruesa, es importante reconocer y clasificar los componentes normales de la sangre, las partes comunes de un glóbulo blanco y los contaminantes comunes de un extendido de sangre (gota gruesa y/o frotis) (WHO, 2010).

Glóbulos rojos: La forma de los glóbulos rojos o eritrocitos, se describe como un disco bicóncavo. Son los componentes más comunes en un extendido fino. Se estiman alrededor de 5.000.000 en un microlitro (μl) de sangre. Con la coloración el glóbulo rojo tiene apariencia de disco grisáceo pálido a rosa claro, de $7,5 \mu\text{m}$ de diámetro. No tienen núcleo y algunos parecen más largos que los glóbulos rojos normales.

Los glóbulos rojos no se observan normalmente en las muestras de gota gruesa, debido a que se lisan en el proceso de coloración. En cambio, estos se observan en el extendido fino o frotis porque esta segunda muestra está fijada con metanol.

Glóbulos blancos: El número de glóbulos blancos o leucocitos, por microlitro de sangre es normalmente entre 4.500 y 10.000, con algunas pequeñas diferencias entre laboratorios. Cada leucocito tiene un núcleo rodeado por un citoplasma granular. Estos se dividen en dos grupos, los polimorfonucleares y los mononucleares.

Dentro los polimorfos se encuentran los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos. Los neutrófilos tienen gránulos bien definidos en el citoplasma y su núcleo se tiñe de púrpura oscuro. Cuando los parásitos de la malaria están presentes, estos pueden contener pigmentos productos del metabolismo del parásito cuando es fagocitado por los neutrófilos. El pigmento de la malaria puede ser color dorado a negro (WHO, 2010).

Los eosinófilos tienen gránulos de color rosado y son un buen indicador de la calidad de la tinción. Los basófilos, son vistos como largos gránulos de color azul después de la tinción.

Dentro de los mononucleares se encuentran los monocitos y los linfocitos. Los monocitos contienen gránulos que se tiñen de color rosado a rojo. Los linfocitos, contienen un área grande de citoplasma, el cual se tiñe de color azul claro y el núcleo se tiñe de color azul oscuro y algunas veces de color negro (WHO, 2010).

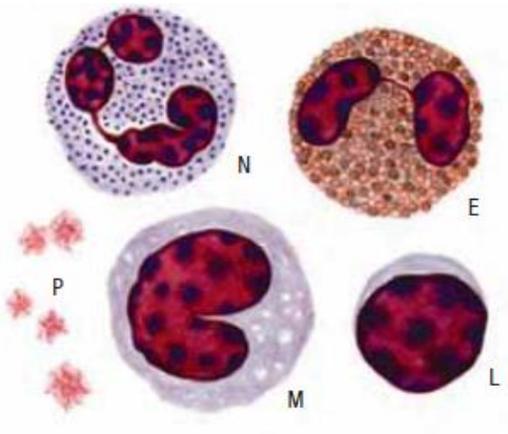
Plaquetas: Las plaquetas son pequeñas, con forma de cuerpos irregulares sin núcleo, pero con unos finos gránulos rojos. Como los eosinófilos, estas son un buen indicador de buena calidad en la tinción. Algunos microscopistas sin experiencia pueden confundirlas con los parásitos de la malaria.

A continuación, se muestran algunas imágenes de la apariencia de los elementos normales de la sangre en una gota gruesa y en un extendido fino:

Leucocitos:

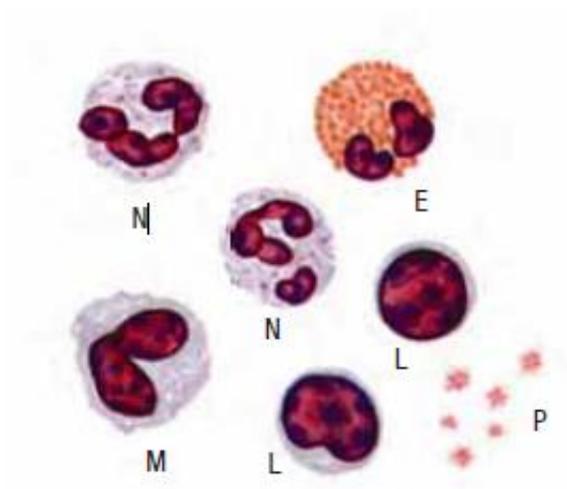
(N=neutrófilos, E=eosinófilos, L=linfocitos, M=monocitos, P=plaquetas)

Extendido fino:



Fuente: (WHO, 2010)

Gota gruesa:

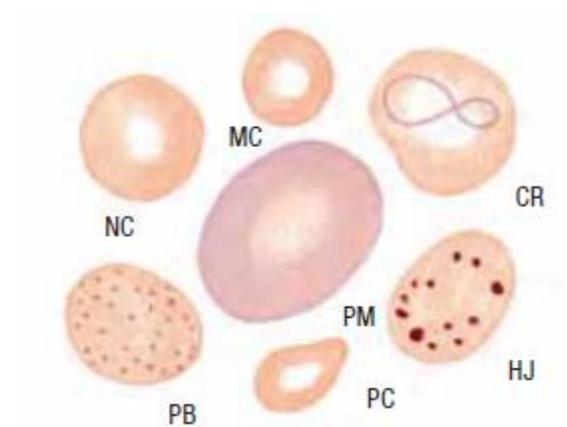


Fuente: (WHO, 2010)

Eritrocito:

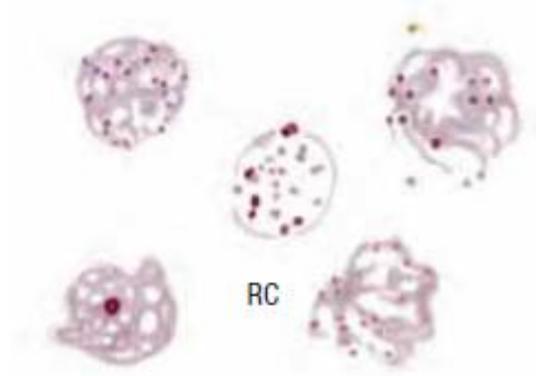
(NC= normocito, MC= microcito, PM=macrocito policromático, PC= poiquilocito, PB= punteado basófilo, CR=anillo de Cabot, HJ=cuerpos de Howell-Jolly, RC=nubes reticulares en anemia severa)

Extendido fino:



Fuente: (WHO, 2010)

Gota gruesa:



Fuente: (WHO, 2010)

Identificación de los parásitos:

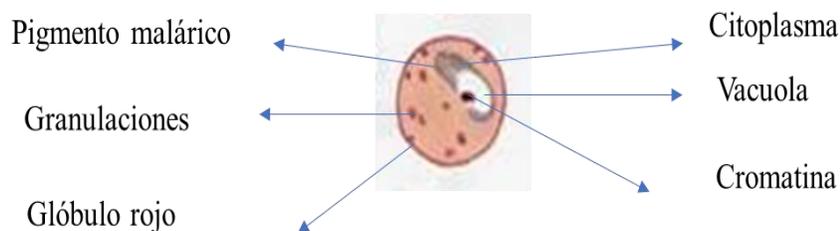
Los parásitos de la malaria pasan por una serie de etapas de desarrollo, durante las cuales su forma varía marcadamente. Sin embargo, las diferentes partes del parásito adquieren la misma coloración en cada etapa. Estas son:

La cromatina, es el núcleo del parásito, normalmente redonda, se colorea rojo intenso.

El citoplasma, se colorea azul; los tonos de azul pueden variar entre las especies.

El pigmento malárico, se observa como una coloración desde amarillo tenue al negro, es el producto de desecho del metabolismo del parásito.

Los punteados o granulaciones del glóbulo rojo son una descripción del efecto del parásito en la célula del huésped, lo cual refiere la buena coloración. Se observan puntos de color rosado en el glóbulo rojo.



Fuente: Modificado de: (WHO, 2010)

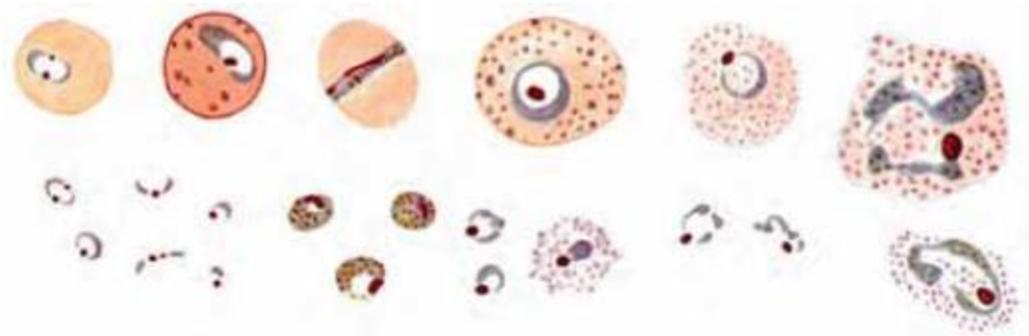
Etapas del parásito:

Trofozoítos: Es posible observar trofozoítos jóvenes y maduros, se caracterizan por tener núcleo, citoplasma y vacuola. En un primer momento de desarrollo tienen citoplasma regular a manera de anillo. Su tamaño varía aún en la misma especie parasitaria. Todas las especies pasan por esta etapa.

El trofozoíto maduro de *P. falciparum* se diferencia del joven por tener pigmento malárico. Mientras que el trofozoíto maduro de *P. vivax* gana más citoplasma, pigmento malárico y se presenta irregular tomando diferentes formas.

En los trofozoítos de *P. falciparum* es más común observar dos puntos de cromatina, pero no es exclusivo de esta especie.

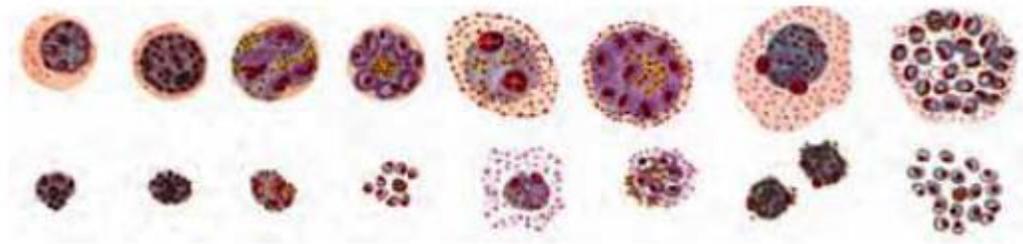
El multiparasitismo (más de una forma parasitaria dentro de un glóbulo rojo) de los glóbulos rojos es más frecuente en las infecciones por *P. falciparum* sin ser exclusivo. Los trofozoítos en la gota gruesa se observan fraccionados en la gota gruesa y de forma completa en el extendido fino.



Arriba: parásitos en un extendido fino. Abajo: parásitos en una gota gruesa.

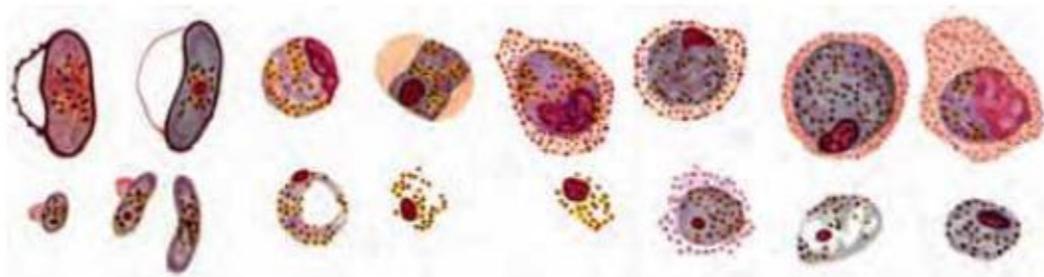
Fuente: Modificado de (WHO, 2010)

Esquizontes: Esta etapa es fácilmente reconocida. Adquiere el nombre de esquizonte cuando el estadio alcanza tres divisiones en su cromatina. Esta etapa claramente define que nuevos parásitos están listos para dejar la célula donde se encuentran e invadir otras nuevas. En infecciones por *P. falciparum*, tanto los trofozoítos maduros como los esquizontes se encuentran adheridos en el endotelio de los capilares profundos (órganos), por lo que no es común verlos en un extendido de sangre periférica en esta especie parasitaria.



Arriba: parásitos en extendido fino. Abajo: parásitos en una gota gruesa.
Fuente: (WHO, 2010)

Gametocitos: Esta etapa ocurre debido a que algunos merozoitos se convierten en formas sexuales formando los gametocitos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) con forma de banana para *P. falciparum* y redondeados para las otras especies que infectan al humano.

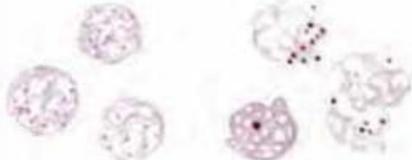
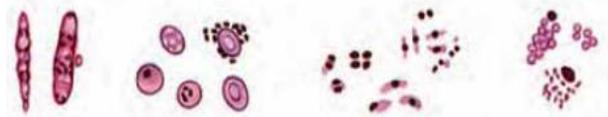
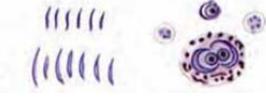


Arriba: parásitos en extendido fino. Abajo: parásitos en una gota gruesa.
Fuente: (WHO, 2010)

Para observar la morfología de los parásitos que ocasionan la malaria ver anexo D y E.

En algunas ocasiones los parásitos pueden ser confundidos con artefactos que pueden estar presentes en la muestra. Algunos de estos se encuentran en la tabla 2 (WHO, 2010).

Tabla 2. Artefactos o estructuras que pueden confundir la detección de Plasmodium SPP

Artefactos	Comentario
	Restos de eritrocitos jóvenes y restos de núcleos derivados de glóbulos rojos inmaduros en anemia severa
	Grupos aislados de gránulos eosinofílicos
	Plaquetas y linfocito
	Bacterias
	Esporas
	Células vegetales
	Hongo
	Partículas de polvo, cristales de colorante de Giemsa
	Rayones en la lámina y daños en el vidrio de la lámina

Fuente: (WHO, 2010)

Cuando se detectan las estructuras parasitarias, se identifica la especie infectante y se hace recuento de esta. Por otra parte, en los lugares donde ocurre alta transmisión parasitaria es posible encontrarse dos (o más) especies concomitantemente en el mismo huésped, en este caso se dice que hay infección mixta y se especifican las especies presentes.

En las Américas cuando se identifica infección mixta, lo común es que las especies presentes sean *P. vivax* acompañada de *P. falciparum* (trofozoítos con o sin gametocitos, o solamente estos últimos). Sin embargo, en lugares de alta transmisión de varias especies parasitarias, puede ocurrir infecciones mixtas en las cuales no hay presencia de gametocitos de *P. falciparum* por lo que es necesario establecer la proporción de trofozoítos regulares compatibles con *P. falciparum* en relación con las formas compatibles con *P. vivax*; si las formas compatibles con *P. falciparum* están en una proporción de $\geq 40\%$ se establece que hay una infección mixta (INS, 2015)

Una vez identificada la especie parasitaria se realiza el recuento parasitario y se calcula la densidad parasitaria. Se finaliza el examen registrando los resultados en el formulario Mal-0-04 Reporte de resultados (ver anexo C).

Para retirar el aceite de la lámina se deja la lámina sobre un papel absorbente suave colocando el lado de la muestra que contiene aceite tocando el papel, se puede ejercer ligera presión hasta observar que la lámina no tenga más aceite de inmersión. Posteriormente se guarda en una caja para almacenamiento de láminas con sílica gel para que pueda ser revisada para el control de calidad indirecto.

A toda muestra con diagnóstico positivo para malaria se le debe hacer un papel filtro como se describió en el numeral 10.3.2.5.

Examen microscópico del Extendido Fino (Frotis)

El frotis no se examina de manera rutinaria debido a que siendo más específico es menos sensible que la gota gruesa. Sólo se recomienda su examen cuando la confirmación de la especie es difícil o cuando la densidad parasitaria es muy alta en la gota gruesa y se desea mayor precisión en el recuento. Otro caso puede ser cuando la gota gruesa se pierde durante el proceso de coloración.

En el extendido fino también es posible calcular el porcentaje de glóbulos rojos infectados.

9.3.1.6. Densidad parasitaria por microlitro de sangre

Establecer la densidad parasitaria de *Plasmodium* spp. permite determinar la severidad de la infección y la eficacia del tratamiento antimalárico, por otra parte, está relacionada con el pronóstico y la conducta médica a tomar con el paciente. La densidad parasitaria se informa en parásitos por microlitro (ul) de sangre.

El número de parásitos en la gota gruesa se cuenta relacionando las formas parasitarias con el número de leucocitos en la gota gruesa y se multiplica por el recuento medio estimado en cerca de 6000 leucocitos por microlitro de sangre.

Para *P. falciparum* se calcula la cantidad de parásitos presentes en la muestra contando por separado los trofozoítos y los gametocitos en el mismo recuento. En cada campo se cuenta paralelamente los glóbulos blancos encontrados.

En el caso de *P. vivax*, se cuentan todas las formas parasitarias (asexuadas y sexuadas) en el mismo recuento. Para el caso de infección mixta se debe hacer el recuento por separado de cada especie diferenciando los gametocitos de *P. falciparum*, cuando estos están presentes. Para determinar el número de glóbulos blancos que se deben contar se siguen los siguientes criterios (WHO, 2010).

- Si después de contar 200 leucocitos, se encuentran 100 o más parásitos, se detiene el recuento y se realizan los cálculos de acuerdo con la fórmula.
- Si después de contar 200 leucocitos, se encuentran 99 o menos parásitos, el recuento debe llevarse hasta contar 500 leucocitos y se aplica la fórmula.
- Si al contar 200 leucocitos, se han encontrado 500 parásitos, se detiene el recuento y se aplica la fórmula genérica.

La fórmula genérica para el cálculo de la densidad parasitaria es la siguiente:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\# \text{ parásitos} \times 6000 \text{ leucocitos } \mu\text{l de sangre}}{\# \text{ leucocitos contados}}$$

En cada caso, la densidad parasitaria se calcula de aplicando una de las siguientes fórmulas:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\leq 99 \text{ parásitos} \times 6000 / \mu\text{l de sangre}}{500 \text{ leucocitos contados}}$$

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\geq 100 \text{ parásitos} \times 6000 \text{ leucocitos } \mu\text{l de sangre}}{200 \text{ leucocitos contados}}$$

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\geq 500 \text{ parásitos} \times 6000 \text{ leucocitos } \mu\text{l de sangre}}{\# \text{ leucocitos contados}}$$

Ejemplos:

- Si se cuentan 203 leucocitos y 100 parásitos, al aplicar la fórmula se tendrá:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{100 \text{ parásitos} \times 6000 \text{ leucocitos}/\mu\text{l}}{203 \text{ leucocitos}}$$

$$\text{Densidad parasitaria} = 2956 \text{ parásitos}/\mu\text{l de sangre}$$

- Si se cuentan 506 leucocitos y 7 parásitos, al aplicar la fórmula se tendrá:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{7 \text{ parásitos} \times 6000 \text{ leucocitos}/\mu\text{l}}{506 \text{ leucocitos}}$$

$$\text{Densidad parasitaria} = 83 \text{ parásitos}/\mu\text{l de sangre}$$

- Si se cuentan 504 parásitos y sólo 94 leucocitos, al aplicar la formula se tendrá:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{504 \text{ parásitos} \times 6000 \text{ leucocitos}/\mu\text{l}}{94 \text{ leucocitos}}$$

$$\text{Densidad parasitaria} = 32170 \text{ parásitos}/\mu\text{l de sangre}$$

Como se observa las cantidades de 200 y 500 leucocitos no siempre son exactas en la práctica del conteo.

Cuando se tiene el recuento de glóbulos blancos del hemograma, es posible hacer el cálculo con este valor en lugar de la constante 6000 leucocitos/ μl , sin embargo, los controles deberán hacerse con el nuevo dato de leucocitos del hemograma del día de control. Si esto no es posible realice su cálculo con la constante establecida.

La parasitemia también es posible calcularla en el extendido de sangre periférica, cuando resulta impreciso contar en la gota gruesa, como cuando se observan ≥ 100 parásitos por campo en la gota gruesa con el objetivo de 100 X. Se procede de la siguiente forma:

- En la parte del cuerpo y la cola del frotis, donde observe que no hay glóbulos rojos sobrepuestos, se realiza un promedio de glóbulos rojos en tres campos que tengan distribución homogénea de células y que se observen semejantes. Posteriormente, se calcula el número de campos que se deben observar para contar 10 000 glóbulos rojos. Este cálculo supone que un campo microscópico con la distribución de glóbulos seleccionada tiene el promedio de glóbulos rojos encontrado en el cálculo. Es así que, si un campo tiene el en promedio de glóbulos rojos encontrado, se plantea una regla de tres para determinar el número de campos requeridos (con distribución y cantidad semejante de glóbulos rojos).

Si hay eritrocitos infectados por *P. falciparum* con formas asexuadas, cuente todos los que están parasitados y por separado reporte las formas sexuadas (gametocitos). Para las otras especies parasitarias cuente los estadios asexuados y sexuados conjuntamente. En las infecciones mixtas, cuente por separado los eritrocitos parasitados por una u otra especie, y notifique la presencia las dos especies con su recuento independiente.

- Conociendo el número de campos, se inicia el conteo en la misma zona donde se estableció el promedio y con un contador de células se marca en una tecla el número de campos y en otra el número de glóbulos rojos parasitados.
- Una vez contabilizado el total de campos y el total de eritrocitos parasitados, se aplica la fórmula. Esta fórmula supone que cada glóbulo parasitado representa a un parásito, indistintamente que tenga más de una forma.

Densidad parasitaria en extendido fino:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\# \text{eritrocitos parasitados} \times \# \text{de glóbulos rojos}/\mu\text{l de sangre}}{10.000 \text{ glóbulos rojos}}$$

Se ha determinado como constante de glóbulos rojos/ μl en la fórmula: 5 000 000.

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\# \text{eritrocitos parasitados} \times 5\,000\,000 \text{ de glóbulos rojos}/\mu\text{l de sangre}}{10.000 \text{ glóbulos rojos}}$$

– Al simplificar la fórmula la densidad parasitaria:

Densidad parasitaria = número de eritrocitos parasitados x 500/ μl de sangre.

El valor se debe reportar como parásitos/ μl de sangre. Si el resultado de la operación matemática da como resultado un número con decimales, entonces se aproxima al entero más próximo cuando el decimal es \geq de 5.

Para obtener el **porcentaje de glóbulos rojos parasitados**, se tiene en cuenta el número de glóbulos rojos parasitados en 10 000 glóbulos rojos y se calcula su equivalencia en 100 glóbulos. De esta forma se obtiene el resultado en porcentaje. Los cálculos de parasitemia y porcentaje de glóbulos rojos parasitados asumen que un glóbulo rojo parasitado equivale a un parásito.

La estimación de la parasitemia en parásitos/ μl es importante para valorar la eficacia del tratamiento antimalárico administrado, identificando precozmente la posible presencia de falla terapéutica.

Se considera que se está frente a una baja parasitemia cuando el porcentaje de glóbulos rojos infectado es inferior a 0,1%, esto representa parasitemia inferiores a 5.000 parásitos/ μl . Por otra parte, se está frente a una parasitemia moderada cuando el porcentaje de glóbulos rojos infectados oscila entre 0,1-0,5%, lo cual representa una parasitemia entre 5.000 y 25.000 parásitos/ μl . Finalmente se considera que se presenta una hiperparasitemia cuando \geq 2% de los glóbulos se encuentra infectado, lo cual equivale a una parasitemia \geq 100.000 parásitos/ μl (Gutiérrez, 2003). Sin embargo, el médico tratante debe hacer siempre correlación con la clínica del paciente ya que cuando el paciente no tiene ningún tipo de inmunidad frente al parásito, puede llegar a complicarse con parasitemia que no son consideradas altas.

9.3.1.7. Informe de los resultados del diagnóstico microscópico

Negativo:

Se emite este resultado cuando al observar 500 campos microscópicos en 100x en la gota gruesa, no se identifican parásitos. Se reporta: No se observan formas parasitarias de Plasmodium spp. en 500 campos microscópicos observados.

Positivo:

Se emite este resultado cuando en el examen microscópico se encuentran formas parasitarias de Plasmodium spp. Se debe informar la especie identificada, los estadios presentes (en el caso de P. falciparum) y la densidad parasitaria.

Especies parasitaria:

Pf: Plasmodium falciparum

Pv: Plasmodium vivax (Casos importados de otros países)

Infección mixta: Pf y Pv (Casos importados de otros países)

Estadios:

Estadios Asexuales Sanguíneos (EAS): Anillos, Trofozoítos y Esquizontes

Estadios Sexuales Sanguíneos (ESS): Gametocitos

Densidad parasitaria:

Aquí se reporta el número de parásitos/ μ l de sangre

Ejemplo del informe completo:

Positivo para P. falciparum

Densidad parasitaria: 3600 EAS y recuento/ μ l: 600 ESS

Positivo para P. vivax

Densidad parasitaria: 3600 EAS y ESS (total de estadios para P. vivax u otra especie).

9.3.2. Diagnóstico mediante pruebas rápidas**9.3.2.1. Fundamento de las pruebas de diagnóstico rápido**

Las pruebas de diagnóstico rápido de malaria (PDR), son pruebas de inmunocromatografía de flujo lateral que detectan antígenos específicos de parásitos en muestras de sangre. Estos antígenos específicos (proteínas) son producidos por los parásitos y están presentes en la sangre de las personas infectadas o que han padecido la infección recientemente. Los antígenos del parásito deben ser liberados mediante la lisis de los glóbulos rojos, los cuales se unen al conjugado (que es un anticuerpo marcado que permite visualizar la reacción de color), por lo tanto, este complejo antígeno anticuerpo migra a lo largo de la nitrocelulosa hasta que es detenido por un anticuerpo monoclonal que se encuentra anclado en un sitio específico de la tirilla generando una línea de color que indica la presencia la positividad por la detección del antígeno parasitario. La prueba tiene una banda control que indica que la muestra migró adecuadamente por la tirilla.

Antígenos de las PDR

Los principales antígenos que detectan las PDR se encuentran en la tabla 3:

Tabla 3. Antígenos blanco de las PDR

Especie de Plasmodium	Antígenos blanco de las PDR para malaria					
	HRP2	pLDH-Pf	pLDH-pan	pLDH-Pvom	pLDH-Pv	Aldolasa
P. falciparum	X	X	X			X
P vivax			X	X	X	X
P malariae			X	X		X
P. ovale			X	X		X

HRP2: Proteína 2 rica en histidina; pLDH: lactato deshidrogenasa de Plasmodium; P.f: P. falciparum; Pan: pan malárico; Pvom: Plasmodium vivax, Plasmodium ovale y Plasmodium malariae; Pv: Plasmodium vivax

Fuente: (WHO, 2011)

Los antígenos blancos para el diseño de las PDR son:

- **Aldolasa:** es una enzima producida por estadios asexuados y sexuados maduros. Es un antígeno común para todas las especies de Plasmodium que infectan al hombre, sin embargo, se ha sugerido sea utilizado como antígeno blanco para las otras especies diferentes de P. falciparum (WHO, 2011).
- **Proteína 2 Rica en Histidina (HRP2):** proteína expresada por los trofozoítos y gametocitos jóvenes de P. falciparum, Es un antígeno muy estable en sangre pudiendo encontrarse hasta las 72 horas después de la negativización de la gota gruesa, sin embargo, es posible encontrarla hasta por varias semanas. Es el antígeno blanco más usado para P. falciparum en las PDR por ser el más sensible (Moody, 2002) (Wongsrichanalai, 2007).
- **Enzima Lactato Deshidrogenasa parasitaria (pLDH):** se expresa cuando el parásito está vivo, es decir, es producida como producto del metabolismo de estadios eritrocíticos asexuados y sexuados maduros. Desaparece de sangre 5 días después de eliminar el parásito con medicamentos. Por presentar diferentes isómeros, puede ser utilizada como antígeno blanco pan-malárico como específico para cada especie parasitaria (Pérez, 2007).

Criterios de selección de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la adquisición de PDR en 2019

- Para la detección de P. falciparum en todos los contextos de transmisión, la puntuación de detección del panel contra las muestras de P. falciparum debe ser al menos del 75% en parasitemia de 200 parásitos/ μ l.
- Para la detección de P. vivax en todos los contextos de transmisión, la puntuación de detección del panel contra las muestras de P. vivax debe ser al menos el 75% en parasitemia de 200 parásitos/ μ .
- La tasa de falsos positivos debe ser menos del 10%.
- La tasa de inválidos debe ser inferior al 5%.

La sensibilidad de las PDR está determinada por la especie de Plasmodium, la cantidad de parásitos presentes en la sangre del paciente, el estado de la prueba rápida, la correcta

aplicación de la técnica recomendada para realizar la prueba, la correcta interpretación de los resultados, la viabilidad de los parásitos y la variación de la estructura y la expresión del antígeno.

Una prueba positiva es determinada por la reacción de color en la banda donde está ubicado el monoclonal específico contra el antígeno parasitario y la reacción en la línea control. Una PDR positiva es confirmatoria para el diagnóstico de malaria y el paciente debe iniciar tratamiento, sin esperar la confirmación por la gota gruesa. Para realizar la evaluación de la concordancia del diagnóstico de la PDR, se debe contar con la gota gruesa, esta actividad que se efectúa en sitios centinela (FIND, 2013).

Un resultado negativo de una PDR no siempre descarta la presencia de una infección malárica ya que los parásitos (antígenos) pueden ser insuficientes para producir la reacción antígeno-anticuerpo; la prueba rápida puede estar dañada lo cual interfiere en su sensibilidad o, es posible que la causa de la enfermedad sea ocasionada por otra especie parasitaria que no detecte la PDR. Por otro lado, un resultado positivo no siempre implica la existencia de malaria ya que se pueden detectar los antígenos de parásitos no viables, por ejemplo, cuando se ha administrado tratamiento antimalárico, hasta por seis semanas posteriores al tratamiento.

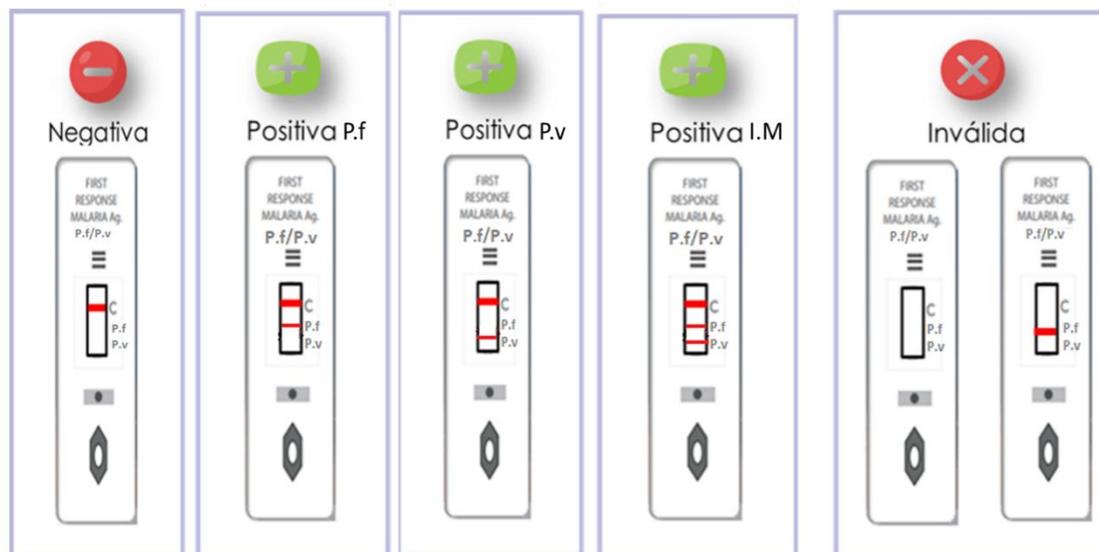
Interpretación de los resultados:

Negativa: reacción únicamente en la línea control

Positiva: diferentes grados de intensidad de la línea T (test o prueba para *P. falciparum*)

Inválida: no hay reacción en la línea de control. Ver Figura 2.

Figura 2. Interpretación de la prueba rápida para el diagnóstico de malaria



Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, interpretación PDR first response P.f/P.v.)

9.3.2.2. Acciones a tomar frente a los resultados de las PDR

Ante una PDR positiva se debe iniciar el esquema de tratamiento indicado según la especie parasitaria infectante y de acuerdo con los lineamientos nacionales.

Ante una PDR negativa se debe investigar paralelamente otra patología, pero si existe alta sospecha de malaria, se debe derivar al paciente para que se realice diagnóstico microscópico y si esto no es posible se debe repetir la PDR cada 24 horas hasta completar 3 muestras.

9.3.2.3. Aplicación de las PDR

La aplicación de las PDR se realiza en centros de salud que no cuenten con diagnóstico microscópico, en focos activos y residuales, y en las áreas con alta vulnerabilidad y receptividad del país (frontera dominico-haitiana), en establecimientos de salud fuera del horario de labor de los microscopistas y en situaciones de brotes.

9.3.2.4. Otras técnicas diagnósticas

Las pruebas basadas en la biología molecular, amplificación de ácido nucleico, tienen utilidad en escenarios de baja transmisión donde es posible encontrar infecciones asintomáticas o submicroscópicas, donde la microscopía y las PDR no son suficientes para el diagnóstico de estas infecciones, pero no son recomendadas para la rutina tanto en la vigilancia como en el manejo de los casos de malaria en ninguna de las situaciones epidemiológicas del control a la eliminación y prevención del restablecimiento.

Los métodos de biología molecular como la Prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en general se utilizan para la detección de parasitemia submicroscópicas, detección de marcadores moleculares y estudios de diversidad genética.

Adicionalmente, la PCR clásica, la PCR cuantitativa y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) son pruebas que pueden ser útiles para realizar encuestas epidemiológicas de malaria, detección de la infección reactiva después de la identificación de un caso índice, tamizaje de población en tratamiento y tamizaje de población especial asintomática (por ejemplo: en los pasos de frontera) (WHO, 2013) (OMS, 2014).

9.3.2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Cuando se realicen investigaciones con PCR, a todo paciente seleccionado, positivo para malaria por diagnóstico microscópico o con PDR se le debe tomar papel filtro a partir de sangre por punción capilar o venosa para estudios de marcadores de resistencia a través del uso de la biología molecular, el envío se realiza semanalmente.

Cuando se recibe el papel filtro Whatman a partir de una adquisición, se deben tener presente las siguientes recomendaciones para su almacenamiento:

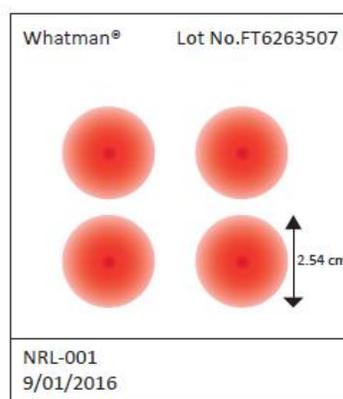
- Conservar en lugar seco, fresco y a temperatura ambiente.
- Se deja en su empaque original el cual debe estar en una caja con paquetes de desecante para garantizar el ambiente seco.

Una vez se abre el empaque del papel filtro, es conveniente guardarlo en una funda con cierre hermético que tenga en su interior paquetes de sílica gel y posteriormente conservarlo en una caja que proteja el contenido. La caja se guarda en las mismas condiciones de temperatura y humedad para garantizar la integridad del papel.

La tarjeta Whatman se identifica con los datos del paciente, posteriormente se impregnan los círculos que están demarcados y se coloca la muestra a partir de la segunda gota de sangre, si la punción es capilar. La sangre debe quedar homogénea y bien impregnada en todo el círculo, sin dejar espacios sin muestra (ver figura 3). La sangre se deja secar completamente a temperatura ambiente o hasta que se observe más oscura, el tiempo va a depender de la temperatura y la humedad ambiental pudiendo tardar hasta 4 horas, sin embargo, nunca se debe exceder las 24 horas.

El papel filtro se guarda en una funda plástica con cierre hermético en cuyo interior debe tener un paquete con sílica gel para evitar que las muestras se contaminen con hongos. Se almacena y transporta a temperatura ambiente semanalmente. El almacenamiento final de estas muestras se hace entre -20 y -70 °C manteniendo un ambiente seco para lo cual se cambia el desecante cada vez que sea necesario (MSP, 2021) (WHO, 2016).

Figura 3. Llenado de los círculos del papel filtro con sangre para diagnóstico por biología molecular



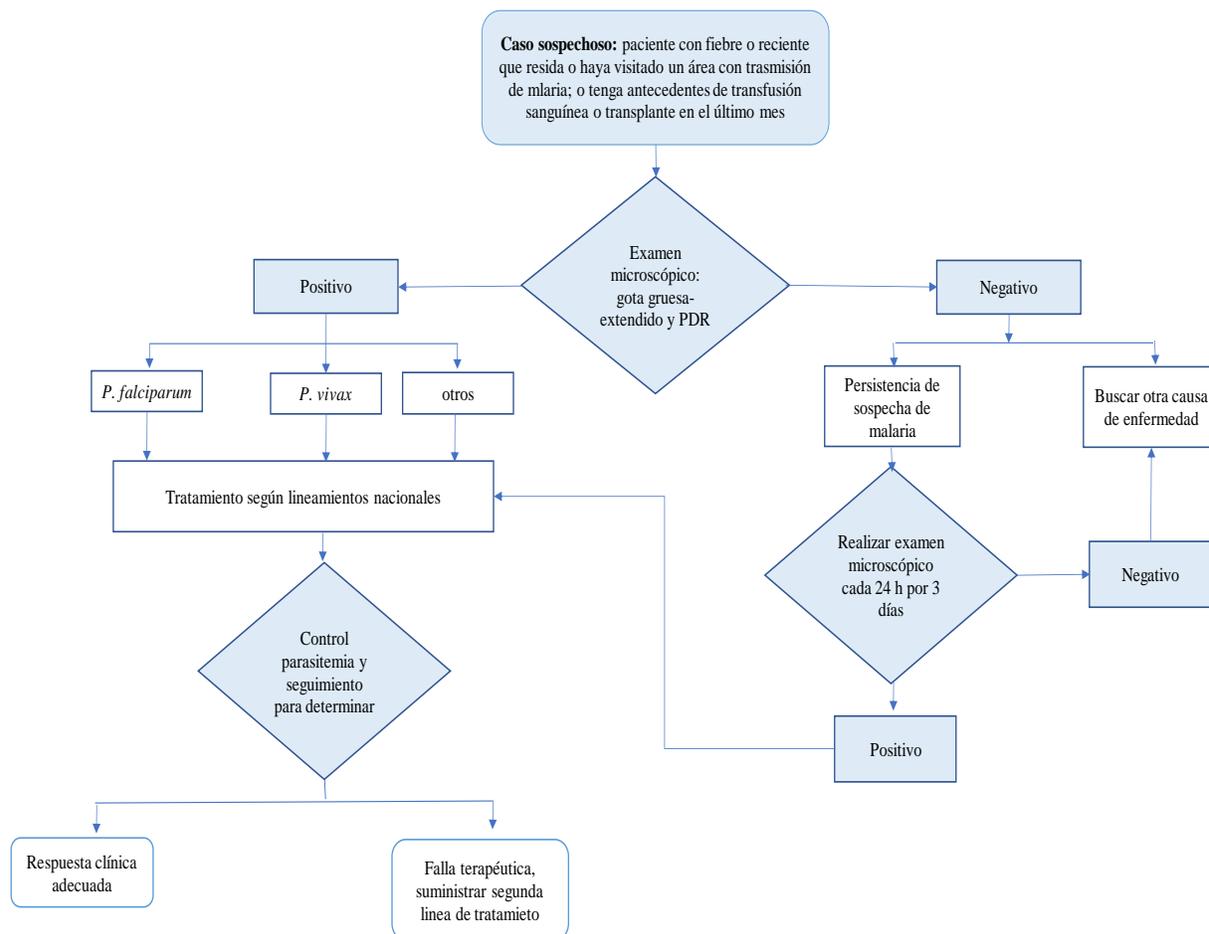
NRL-001
9/01/2016

Fuente: (WHO, 2016)

9.4. Algoritmo para el diagnóstico y tratamiento de la malaria no complicada

En la figura 4 se muestra el algoritmo de la conducta a seguir ante la sospecha de un paciente con malaria no complicada.

Figura 4. Algoritmo para el diagnóstico y tratamiento de malaria no complicada



Fuente: (MSP, 2021)

9.5. Reporte de resultados

Los resultados del análisis microscópico de muestras para gota gruesa y de las pruebas rápidas para diagnóstico de malaria deberán consignarse en el formulario diseñado para este fin denominado “Reporte de Laboratorio”. (Anexo C: Formulario Mal-004). Este formulario se utiliza para el reporte individual de los resultados de las pruebas para el diagnóstico de hematozoarios.

También, deberán introducirse en la plataforma web del Sistema Nacional de Vigilancia (SINAVE), en la parte de registro de los resultados de laboratorio que forma parte del Módulo de Identificación de Agentes Etiológicos Circulantes, dentro del Sub-Sistema de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Vectores (SV-ETV) y según el Protocolo Nacional de Vigilancia de Enfermedades Tropicales de Notificación Obligatoria (Código: DIGEPI-VE-MALARIA-PRO-1" Versión: 01. Fecha de elaboración:10/marzo/2018. Fecha de revisión: 10/junio/2020. Acápito 7.1.3), dice lo siguiente: el personal de salud prestador de la atención, personal del laboratorio que confirma el diagnóstico y/o el personal de las DPS/DAS que realiza la búsqueda activa a nivel comunitario, notifica individualmente al servicio de epidemiología dentro de las 24 horas todos los casos de malaria que cumplan con la definición (caso sospechoso o confirmado), utilizando el formulario establecido para los fines o directamente a través de la plataforma web del SINAVE accesible en <http://digepisalud.gob.do/>.

9.5.1. Reporte de casos

Todo caso confirmado por microscopia o prueba rápida debe ser reportado de inmediato al servicio de epidemiología más cercano. En aquellos establecimientos de salud que cuenten con servicios de epidemiología, los médicos se encargarán del llenado de las fichas clínico-epidemiológicas, formularios de registro y su envío a los niveles correspondientes. Del mismo modo deberá comunicarse a las Direcciones Provinciales y Direcciones de Área de Salud y al Departamento de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores y Zoonosis, para apoyo al diagnóstico, tratamiento supervisado, búsqueda reactiva de casos en el presunto lugar de infección y otras medidas de control.

Los casos confirmados en los laboratorios de la red en los niveles I y II serán reportados semanalmente por el microscopista a los laboratorios del nivel III y de estos al laboratorio de Referencia Nacional. Para estos fines se utilizará el formulario Lab-0042 (Informe Semanal de Notificación de Casos Positivos). En este formulario se reporta el nombre del laboratorio notificador, la semana epidemiológica en que la muestra es examinada y la densidad parasitaria, entre otros datos (ver anexo F).

9.5.2. Registros del nivel local

Como producto del diagnóstico de malaria los laboratorios locales deben llenar el formulario para informe semanal de notificación de casos positivos (EPI-2) donde se registra la información de las láminas que son enviadas para el control de calidad indirecto, además el informe semanal de producción del laboratorio de parasitología (EPI-10) donde se registra el resultado de las láminas que se examinan durante la semana y se diferencia el tipo de búsqueda por la cual fue captado el paciente, por otra parte, se llena el control de rendimiento del laboratorio (EPI-26) donde se totaliza día a día las láminas que ingresan, las que se procesan y las que quedan de saldo por tipo de búsqueda según sea activa y pasiva. Ver los anexos G, H e I, respectivamente.

9.6. Indicadores relacionados con el laboratorio

Estas variables nos sirven para medir los cambios, contribuyendo a medir en forma cuantitativa o cualitativa, sucesos colectivos, por lo que sirven para evaluar determinados aspectos del servicio y además para realizar el seguimiento de dichas medidas a lo largo del tiempo y para poder comparar los datos en diferentes periodos de tiempo, o entre diferentes lugares de un mismo sector en el mismo periodo.

Los indicadores de control de un proceso, función u organización deben ser fáciles de medir, proporcionar información relevante, permitir que su medición pueda ser realizada rápidamente y ser fáciles de graficar. Deben tener carácter sistemático y continuo.

Índice parasitario anual (IPA)

Concepto: Proporción anual de casos de malaria confirmados mediante evaluación microscópica o pruebas rápidas entre la población de un área geográfica determinada (localidad, municipio, provincia) para ese mismo año calendario.

Utilidad: Permite evaluar el impacto de las diferentes intervenciones de prevención y control de la malaria en las áreas bajo evaluación. Se utiliza para la clasificación del riesgo de las áreas geopolíticas en: alto riesgo (10 o más casos por cada mil habitantes), moderado riesgo (entre 1 y 9,99 casos por cada mil habitantes) y bajo riesgo (menos de 1 caso por cada mil habitantes).

Cálculo del indicador:

Numerador: Número de casos de malaria detectados por microscopia o mediante el uso de pruebas rápidas, ocurridos en una jurisdicción o área geográfica definida durante un año calendario.

Denominador: Población en riesgo para el año calendario establecido de un área geográfica definida.

Cálculo: Número de casos de malaria detectados por microscopia o mediante el uso de pruebas rápidas dividido para población en riesgo por 1000.

En la actualidad el cálculo del IPA ha sido reemplazado por la estratificación del país por escenarios/estratos que se determina en base al número absoluto de casos por año, la receptividad y el riesgo de importación (vulnerabilidad).

Durante el mes de enero de cada año, se imprime el reporte de casos de malaria por municipios del sistema automatizado de vigilancia epidemiológica de la malaria, para el período entre el primero de enero y el 31 de diciembre del año anterior.

Periodicidad: Anual.

Índice de Muestras Positivas:

Concepto: proporción de casos positivos detectados por microscopía o por gota gruesa en relación con el total de muestras examinadas procesadas mensualmente en un área geográfica determinada.

Utilidad: sirve para determinar la positividad de malaria en el total de muestras procesadas medir por laboratorio en los establecimientos de salud, puestos de diagnóstico de PDR y realizados bien por Microscopía o PDR.

Numerador: número total de casos de malaria detectados y confirmados por el laboratorio (suma de casos confirmados por PDR y por gota gruesa).

Denominador: total de muestras leídas por microscopía y por PDR (suma de muestras positivas y negativas).

Cálculo: número total de casos de malaria detectados dividido para total de muestras leídas (microscopía y PDR) por 100.

Periodicidad: mensual y anual

Índice Anual de Muestras Examinadas:

Concepto: proporción de muestras examinadas por microscopía o por PDR en relación con la población de riesgo en un año, en un área geográfica determinada.

Utilidad: sirve para determinar el esfuerzo de tamizaje de malaria en la población de riesgo.

Numerador: total de (suma de muestras positivas y negativas) muestras leídas por microscopía y por PDR.

Denominador: Población en riesgo para el año calendario establecido de un área geográfica definida.

Cálculo: número total de muestras examinadas dividido para la población en riesgo por 100.

Periodicidad: anual

Muertes por malaria confirmadas vistas en los establecimientos de salud:

Concepto: Número de muertes ocurridas en pacientes en los cuales se pudo confirmar el diagnóstico de malaria mediante la observación microscópica del Plasmodium, la realización de una prueba rápida, o cualquier otro método diagnóstico reconocido o evaluación obtenida post-mortem.

Utilidad: Es un indicador indirecto de la calidad de la atención que reciben los pacientes con malaria, en términos de oportunidad diagnóstica, tratamiento oportuno y adecuado, manejo de las complicaciones y seguimiento del caso de acuerdo con la normativa correspondiente.

Cálculo del indicador: Se obtiene el número absoluto de fallecimientos atribuibles a malaria obtenidas mediante el sistema automatizado de vigilancia epidemiológica que cumplan con los criterios establecidos en la definición.

Periodicidad: Anual.

9.7. Control de insumos y reactivos

En las tablas 4, 5 y 6 se encuentra la cantidad de insumos reactivos necesarios para el diagnóstico microscópico:

Tabla 4. Requerimientos de insumos para gota gruesa

Insumos	Unidad de medida	Insumos necesarios por número muestra					
		1	25	50	100	500	1000
Láminas portaobjeto	Unidad	1	25	50	100	500	1000
Algodón hidrófilo	Gramos	2	50	100	200	1000	2000
Lancetas estériles descartables	Unidad	1	25	50	100	500	1000
Guantes para laboratorio clínico	Par	1	25	50	100	500	1000
Alcohol étlico 70% (etanol)	Mililitros	2	50	100	200	1000	2000

Fuente: Modificado WHO, 2021

Tabla 5. Requerimientos de reactivos para gota gruesa según muestras a procesar

Insumos	Unidad de medida	Insumos necesarios por número de muestras					
		1	25	50	100	500	1000
Aceite de inmersión	Mililitros	0,15	3,75	7,5	15	75	150
Solución stock de Giemsa	Microlitros	500	12500	25000	50000	250000	500000
	Mililitros	0,5	12,50	25	50	250	500
	Gotas	10	250	500	1000	5000	10000
Ortofosfato disódico anhidro*	Gramos	0,01817	0,45417	0,908	1,82	9,08	18,17
Ortofosfato monopotásico*	Gramos	0,01517	0,37917	0,758	1,52	7,58	15,17
Metanol[∞]	Mililitros	50	50	50	100	150	300
Buffer*	Mililitros	10	250	500	1000	5000	10000

Las cantidades de sales fosfato y buffer se calcularon al doble previendo los derrames,

[∞] La cantidad de metanol requerida en la fijación para 1 a <100 muestras es un volumen constante de 50 ml, para 100 -334 muestras corresponde a 100 ml, por requerir la inmersión de la(s) lámina(s) en un recipiente. Para cantidades >334 se multiplica la cantidad de muestras por 0,3 ml de metanol para obtener el requerimiento total.

Fuente: Modificado (MSP, 2021)

Tabla 6. Requerimientos de reactivos para precoloración con azul de metileno fosfatado según número de muestras

Insumos	Unidad de medida	Insumos necesarios por número de muestras					
		1	25	50	100	500	1000
Azul de metileno	Gramos	0,002	0,05	0,1	0,2	1	2
Ortofosfato disódico anhidro	Gramos	0,006	0,15	0,3	0,6	3	6
Ortofosfato monopotásico	Gramos	0,002	0,05	0,1	0,2	1	2
Volumen ml de azul de metileno fosfatado	Mililitros	3	75	150	300	1500	3000

Nota: para el cálculo final de sales fosfatadas se deben sumar la necesidad obtenida en cada una de las tablas 4 y 5 (se para obtiene las cantidades necesarias para la solución de trabajo, enjuagues y los requerimientos para preparar el azul de metileno fosfatado).
Fuente: (MSP, 2021)

9.8. Manuales y registros

9.8.1. Manuales

Los laboratorios de la red nacional de laboratorios para el diagnóstico de la malaria deben contar como mínimo con los siguientes manuales:

- Manual de normas internas de la institución
- Manual de bioseguridad.
- Manuales de operación o del usuario de los equipos.
- Manual de diagnóstico parasitológico de la malaria
- Manual para el aseguramiento de la calidad del diagnóstico de malaria.

9.8.2. Registros

Los laboratorios de la Red para el diagnóstico de la malaria deben contar como mínimo con los siguientes registros:

- Registro de Habilitación del Laboratorio expedido por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
- Registros de las actividades del Programa de Evaluación Interna de Calidad
- Registros de participación en Programas de Evaluación Externa de Desempeño (Laboratorio de Referencia Nacional)
- Registros de participación en la evaluación Indirecta del Desempeño o chequeo cruzado
- Registros de pacientes con los datos correspondientes.
- Registros de estadísticas de pruebas

- Registros de personal
- Registro de quejas, reclamos y acciones tomadas para su solución
- Registros de bioseguridad

9.8.3. Sistema de archivo

Los laboratorios de la red deben disponer de un sistema de archivo electrónico o en papel, que garantice la confidencialidad de los usuarios y que pueda ser manejado por cualquier miembro autorizado del personal. Los registros de pacientes, técnicos o de calidad deben ser legibles, estar firmados o autorizados, protegidos y conservados en un lugar seguro, de forma que se puedan recuperar con facilidad y no ser usados por personal no autorizado.

Los registros de pacientes deben ser mantenidos por un periodo mínimo de 5 años. De igual manera, los registros de incidentes y accidentes laborales, con las correspondientes acciones tomadas, deben archivar permanentemente. En tanto, los registros de capacitación del personal deben mantenerse archivados mientras el personal permanezca en la institución.

9.8.4. Trazabilidad

Todas las muestras recibidas deben registrarse en algún sistema de registro, de acuerdo con el nivel de complejidad y a las posibilidades tecnológicas del laboratorio (libros de entrada, sistema automatizado u otro sistema de registro. Estos datos deben estar disponibles para el personal del laboratorio y otro personal de salud que solicite información y a su vez como insumo para el sistema de vigilancia epidemiológica a través de la notificación oportuna.

El registro debe asignar a cada muestra un número de identificación que permita dar seguimiento a todos los procesos vinculados con la muestra.

9.8.5. Personal

Los laboratorios pertenecientes a la Red deberán estar integrados por un número conveniente de profesionales de bioanálisis y/o técnicos debidamente capacitados para desarrollar las funciones asignadas. Deberán tener descrito el perfil del personal que requerirán para desarrollar y cumplir con sus funciones, un organigrama, políticas de personal y descripción de labores que definan las calificaciones y deberes para todo el personal.

La gerencia del laboratorio debe implementar acciones para mantener actualizado a su personal. El personal cumplirá con los principios descritos en el código de ética profesional del Colegio Dominicano de Bioanalistas (CODOBIO), observando el respeto y la discreción en cuanto a sus relaciones con los pacientes, familiares, compañeros de

trabajo y otros usuarios y en lo referente a los resultados u otras informaciones pertenecientes a los pacientes.

9.9. Programa de mantenimiento preventivo y correctivo de microscopios

La dirección del laboratorio debe poseer un programa de mantenimiento preventivo y correctivo de control para sus equipos. Este programa debe incluir:

- Un sistema de control de inventario y codificación interna para sus equipos (nombre y descripción del equipo, código o número de serie, fabricante, distribuidor, persona de contacto y número de teléfono, condiciones en las que se recibe, condiciones y fecha de adquisición y fecha de puesta en servicio).
- Normas y procedimientos para el cuidado y preservación de los equipos.
- Registro de los servicios de calibración (cuando aplique), mantenimiento y control.
- El personal debe dar seguimiento al programa de control de equipos.

El microscopio

El microscopio es el instrumento básico para el diagnóstico de la malaria por el método de la gota gruesa, es un instrumento costoso y delicado que requiere cuidados específicos para su buen uso y mantenimiento adecuado. En tal sentido podemos citar las recomendaciones siguientes:

- Coloque el microscopio en una superficie nivelada y estable, donde no haya equipos que produzcan vibración, lejos de la luz del sol, ventanas abiertas, lavaderos y lugares húmedos.
- Limpie diariamente la superficie del instrumento.
- Descontamine el microscopio semanalmente según el procedimiento para la limpieza de equipos.
- Inspeccione mensualmente el cordón y las instalaciones eléctricas para verificar que se encuentran en buen estado.
- Para movilizar el microscopio de un sitio a otro, sosténgalo en posición vertical y tómelo por el brazo y por la base. El cordón se deberá enrollar sobre sí mismo, no alrededor del cuerpo del microscopio.
- Una gota de aceite de inmersión es suficiente para el examen de una lámina, sin embargo, si el lente no se limpia adecuadamente al terminar de usarlo, el aceite se secará sobre el lente y producirá situaciones indeseables para el microscopista. Evite que el aceite caiga sobre la platina.
- Durante el examen microscópico no permita que el aceite toque los objetivos de 10 X, ni de 40 X.
- Enfoque siempre hacia arriba y no hacia abajo, para evitar que el lente pueda rayarse o golpearse con la lámina o la platina.
- La luz del microscopio debe graduarse con el diafragma del condensador dependiendo del objetivo que se esté utilizando.
- Verifique los desplazamientos mecánicos de la platina y el portaobjetos; limpie y lubrique cuando corresponda.

- Use el botón de micrométrico para lograr mejor enfoque de la imagen.
- Es preferible el uso de un microscopio con fuente de luz halógena incorporada, ya que la iluminación es un factor crítico cuando se usa el objetivo de inmersión.
- Tenga a mano un bombillo de repuesto, para cuando se quemara el que está en uso.
- El sistema óptico y de iluminación nunca deberá ser tocado con los dedos.
- Los objetivos y oculares deben ser limpiados por un técnico calificado, así como cualquier reparación que sea necesaria.
- No se deberán colocar los portaobjetos mojados sobre la platina, del mismo modo se evitará manejarlo con las manos húmedas o mojadas.
- Cuando termine su labor, cubra con cobertores de tela, los de plásticos producen más calor, mantienen la humedad y favorecen la formación de hongos en los lentes.
- Mantenga al día los registros de mantenimiento preventivo y control.

9.10. Medidas de bioseguridad

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

Los laboratorios de la red deben desarrollar e implementar un programa de bioseguridad que cubra los aspectos de seguridad personal, seguridad de la infraestructura, manejo de muestras, sustancias químicas y desechos, así como también accidentes laborales, de acuerdo con lo descrito en las Normas Nacionales de Bioseguridad del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y en la guía técnica de bioseguridad en laboratorio clínico (Dirección de Laboratorios Clínicos; Ministerios de Salud Pública y Asistencia Social, 2016).

Este programa de bioseguridad debe incluir medidas dirigidas y aplicables al personal, la vestimenta, los ambientes, la obtención de muestras, el envío de muestras al laboratorio, los casos de accidentes y la infraestructura del laboratorio.

9.10.1. Medidas de bioseguridad personal

Trabajar en un laboratorio aumenta el riesgo de enfermar por la exposición a los agentes biológicos, sea a través de accidentes con agujas o materiales cortopunzantes contaminados, aerosoles, manejo de material contaminado o por falta de vacunación. De igual modo, se tienen presente todas las medidas de protección dependiendo del factor biológico, químico o físico que pudiera poner en riesgo la seguridad del personal del laboratorio.

Para realizar tareas dentro del laboratorio es obligatorio, para proteger la salud del personal, el uso de mascarillas, gafas o viseras, batas cerradas, guantes desechables y zapatos cerrados. Del mismo modo el personal debe llevar el pelo recogido.

Toda persona cuyos guantes se encuentren contaminados, debido a que esté realizando alguna toma de muestra o proceso analítico, no deberá tocarse la cara, la boca o el pelo, ni tocar objetos tales como: teléfonos, bolígrafos, gavetas o puertas, cuadernos y otros objetos similares.

Está absolutamente prohibido pipetear con la boca y no se permite la aplicación de cosméticos, peinarse o manipular lentes de contacto u otros objetos personales en las áreas de trabajo.

No se debe comer, fumar ni beber dentro del área de trabajo, ni se debe guardar agua o alimentos en las neveras, hornos o congeladores destinados al almacenamiento de muestras o reactivos.

Se deben lavar las manos con jabón o solución desinfectante durante todo el proceso de la atención a las personas, al entrar, al salir del laboratorio y las veces sea necesario. Se recomienda utilizar toallas desechables para el secado de las manos. Cuando no hay disponible agua y jabón se pueden utilizar geles de base alcohólica con una base de 70% para frotarse las manos por 15 segundos, posteriormente el/la bioanalista deberá lavarse las manos con agua y jabón tan pronto estén disponibles.

Se debe evitar usar ropa con las mangas largas que sobresalgan de las mangas de la bata, puños, pulseras, anillos u otros elementos que puedan provocar accidentes.

Todo el personal que labore en el laboratorio debe estar vacunado, por lo menos contra el Tétanos y la Hepatitis B. Los registros deben mantenerse actualizados.

9.10.2. Seguridad de la infraestructura

El laboratorio es un área de acceso restringido, al cual sólo deben ingresar personas autorizadas, por tal razón en los laboratorios de la red deben existir y mantenerse en buen estado, las orientaciones y avisos de precauciones instalados en lugares visibles para la seguridad de los pacientes, del personal y del público en general.

El laboratorio debe ser un lugar completamente limpio, estar dotado de puerta de emergencia correctamente señalizada, extintores de incendio e instrucciones de uso. Los extintores de incendio deben estar en vigencia, estar colocados en lugares visibles y de fácil acceso.

La limpieza de los locales, muebles, equipos, mesetas de trabajo y cristalería, será realizada por el personal de limpieza, utilizando solución desinfectante. Al concluir las labores cotidianas, todas las áreas analíticas deben ser limpiadas y desinfectadas. El personal de la dirección es responsable de su supervisión y el resto del personal debe velar por su mantenimiento.

No se deben colocar abanicos en las áreas analíticas ni en otras áreas donde se manipulen muestras o desechos para evitar la propagación de aerosoles.

9.10.3. Manejo de muestras

Las muestras deberán ser manejadas con extremas medidas de seguridad, asumiendo que las mismas son un material potencialmente infeccioso.

Se debe comprobar que las muestras de gota gruesa recibidas estén debidamente identificadas y si la muestra es sangre total, el tubo de ensayo que la contiene debe estar además de identificado, limpio por fuera y en buenas condiciones.

La dirección del laboratorio debe asegurar que el personal que transporta las muestras esté capacitado para realizar esta labor y que conozca los riesgos a los que se encuentra expuesto.

Debe establecerse un procedimiento para envío a otros laboratorios que incluya acciones para la protección del personal que transporta las muestras, de la comunidad y del medio ambiente y que garantice además la estabilidad, calidad e integridad de la muestra durante el periodo de transporte, de acuerdo con lo establecido en las Normas de Bioseguridad del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

Si la dirección del laboratorio no controla directamente el transporte de las muestras, debe establecerse un sistema que permita monitorear el transporte de estas al laboratorio al cual se refiere u otro lugar, y velar porque sean transportadas en las condiciones antes señaladas.

9.10.4. Manejo de sustancias químicas

Los laboratorios de la red para el diagnóstico de la malaria deben tener un inventario actualizado de todas las sustancias químicas que utilizan o almacenan y los neutralizantes correspondientes para poder dar respuesta a cualquier emergencia que pudiese presentarse. Todos los reactivos y sustancias químicas deben estar etiquetados claramente especificando, el riesgo o peligro de este y cuáles son las medidas específicas para su manejo.

9.10.5. Manejo de desechos

El material contaminado no debe acumularse y si es necesario hacerlo, este debe estar en recipientes tapados y debidamente identificados. Por el sistema de desagüe (fregaderos) sólo se deben eliminar los agentes biológicos o químicos previamente descontaminados, neutralizados o inactivados. Los desechos cortopunzantes deben ser colocados en envases conteniendo solución de cloro al 0,5%, (comúnmente conocido como al 10%), de paredes rígidas, con tapa de rosca, a presión u otra parecida. De igual manera, los desperdicios se deben colocar en el lugar adecuado y deben ser tratados de acuerdo con las normas y procedimientos específicos para tales fines.

Al final de la jornada diaria de trabajo, los materiales sucios, los desperdicios y la basura deben ser recogidos, y preparados, los que procedan, para su posterior lavado o eliminación.

9.10.6. Accidentes laborales

Cualquier accidente que se produzca dentro del laboratorio o relacionados a las labores propias, independientemente de su magnitud o complejidad, debe ser notificado inmediatamente al nivel superior correspondiente o al responsable de Bioseguridad para el manejo correcto y oportuno del mismo, siendo responsabilidad de la dirección o encargado del laboratorio, remitirlo al centro de salud correspondiente y guardar registros de dichos accidentes, los cuales deben incluir las medidas tomadas para el tratamiento de los mismos.

9.10.7. Instrucciones para el lavado de manos

El lavado de las manos contribuye a reducir las posibilidades de infecciones diversas, por lo que es importante que este se haga de forma adecuada. Para esto es necesario agua de la llave, jabón o solución jabonosa antiséptica y una toalla de papel desechable.

Se sube las mangas de la bata de laboratorio hasta arriba del codo. Se toma el jabón o solución jabonosa con las manos secas o se coloca sobre la palma de la mano la solución antiséptica a utilizar. Luego se abre la llave, teniendo cuidado de no pegar las manos al lavamanos. Se mojan las manos con un poco de agua y con el jabón o solución jabonosa antiséptica se friccionan incluyendo el antebrazo durante no menos de 20 segundos, especialmente en los pliegues interdigitales. Se enjuaga bien con suficiente agua, y se seca el área lavada utilizando una toalla de papel; el mismo que se utiliza para cerrar la llave. Posterior a esto se descarta el papel toalla en el zafacón, cuidando de no volver a contaminarse las manos.

Recomendaciones:

- Tener las uñas cortas y limpias
- No usar uñas artificiales ni esmalte
- Retirar las joyas.
- Para abrir y cerrar la llave use una toalla de papel limpia (Mejía, 2012).

10. Referencias

10.1. Referencias bibliográficas

- WHO. (2020). World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. World malaria report 2020. Geneva: WHO. Obtenido de <https://www.plataformalac.org/2020/11/informe-mundial-sobre-la-malaria-2020/>
- OMS. (2015). Estrategia técnica mundial contral la malaria 2016-2030. Obtenido de OPS: <https://www.paho.org/es/documentos/estrategia-tecnica-mundial-contral-malaria-who>. WHO. (2010). Basic malaria microscopy. Part I. Learner's guide (Vol. 2). Geneva, Switzerland: World Health Organization. Recuperado el 10 de julio de 2021, de <https://www.who.int/publications/i/item/9241547820>
- MISPAS. (Diciembre de 2010). SCRIBD. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/82431744/Manual-de-Elaboracion-de-Normas-y-Documentos-Tecnicos>
- WHO. (2013). Meeting report of the Evidence Review Group on malaria diagnosis in low transmission settings. Geneva. Obtenido de <https://www.who.int/publications/m/item/meeting-report-of-the-evidence-review-group-on-malaria-diagnosis-in-low-transmission-settings>
- OPS. (1988). Diagnóstico de Malaria. Washington: Organización Panamericana de la Salud.
- SNEM. (2008). Manual operativo estándar para la gestión del diagnóstico microscópico de Plasmodium. Ecuador. Obtenido de <https://www.orasconhu.org/documentos/ECU%20Anexo%20171%20PAMAFRO.pdf>
- Dirección de Laboratorios Clínicos; Ministerios de Salud Pública y Asistencia Social. (2016). Guía técnica de bioseguridad en laboratorios clínicos. MISPAS.
- Gutiérrez, S. y. (2003). Manual de procedimiento de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Lima, Perú: Ministerio de Salud. Recuperado el 16 de Junio de 2021, de http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163_malaria.pdf
- Mejía, R. B. (2012). Manual de procedimientos estándar para el diagnóstico de la malaria. Tegucigalpa, Honduras: Publigráfica S. de R.L. Recuperado el 17 de Junio de 2021

- National Parasitology Reference Laboratory. (s.f.). UK NEQAS. Obtenido de http://ukneqasmicro.org.uk/parasitology/images/pdf/BloodParasitology/MalariaSpecies/EDTA_Effects.pdf
- Iannacone, J. C. (1999). La técnica de precoloración de Walker para evaluar *Plasmodium vivax* Grassi y *Plasmodium malariae* Laveran en comunidades Asháninkas en Satipo (Junín, Perú). *Rev peru biol*, 6(2), 171-180. Recuperado el 17 de Junio de 2021, de <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/8312/7237>
- INS. (2015). Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento. Bogotá, D.C.: Milenio Editores. Recuperado el 17 de Junio de 2021, de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-diagnostico-malaria-no-complicada.pdf>
- WHO. (2011). Good practices for selecting and procuring rapid diagnostic tests for malaria. Geneva: World Health Organization. Obtenido de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44530>
- Moody, A. (2002). Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev*, 15, 68-78. Obtenido de <https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.66-78.2002>
- Wongsrichanalai, C. B. (2007). A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 77, 119-127. Recuperado el 2021 de Junio de 18, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1695/>
- Pérez, H. B. (2007). El paludismo y las pruebas rápidas de diagnóstico. , 47(1). *Bol Mal Salud Amb*, 47(1). Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482007000100001
- FIND. (2013). FIND Diagnosis for all. Recuperado el 18 de junio de 2021, de <https://www.finddx.org/reports-and-landscapes/malaria-rapid-diagnostic-tests-an-implementation-guide/>
- OMS. (Septiembre de 2014). PAHO. Recuperado el 2021 de Junio de 18 , de <https://www.paho.org/en/node/64468>
- MSP. (2021). Diagnóstico de malaria. Manual. Quito, Ecuador.
- WHO. (1 de Enero de 2016). Organización Mundial de la Salud . Obtenido de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340470>

10.2. Bibliografía

- Dirección de Laboratorios Clínicos; Ministerios de Salud Pública y Asistencia Social. (2016). Guía técnica de bioseguridad en laboratorios clínicos. MISPAS.
- FIND. (2013). FIND Diagnosis for all. Recuperado el 18 de junio de 2021, de <https://www.finddx.org/reports-and-landscapes/malaria-rapid-diagnostic-tests-an-implementation-guide/>
- Gutiérrez, S. y. (2003). Manual de procedimiento de laboratorio para el diagnóstico de malaria. Lima, Perú: Ministerio de Salud. Recuperado el 16 de Junio de 2021, de http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/163_malaria.pdf
- Iannacone, J. C. (1999). La técnica de precoloración de Walker para evaluar *Plasmodium vivax* Grassi y *Plasmodium malariae* Laveran en comunidades Asháninkas en Satipo (Junín, Perú). *Rev peru biol*, 6(2), 171-180. Recuperado el 17 de Junio de 2021, de <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/8312/7237>
- INS. (2015). Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento. Bogotá, D.C.: Milenio Editores. Recuperado el 17 de Junio de 2021, de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-diagnostico-malaria-no-complicada.pdf>
- Mejía, R. B. (2012). Manual de procedimientos estándar para el diagnóstico de la malaria. Tegucigalpa, Honduras: Publigráfica S. de R.L. Recuperado el 17 de Junio de 2021
- MISPAS. (Diciembre de 2010). SCRIBD. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/82431744/Manual-de-Elaboracion-de-Normas-y-Documentos-Tecnicos>
- Moody, A. (2002). Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clin Microbiol Rev*, 15, 68-78. Obtenido de <https://doi.org/10.1128/CMR.15.1.66-78.2002>
- MSP. (2021). Diagnóstico de malaria. Manual. Quito, Ecuador.
- National Parasitology Reference Laboratory. (s.f.). UK NEQAS. Obtenido de http://ukneqasmicro.org.uk/parasitology/images/pdf/BloodParasitology/MalariaSpecies/EDTA_Effects.pdf
- OMS. (Septiembre de 2014). PAHO. Recuperado el 2021 de Junio de 18 , de <https://www.paho.org/en/node/64468>
- OMS. (2015). Estrategia técnica mundial contra la malaria 2016-2030. Obtenido de OPS: <https://www.paho.org/es/documentos/estrategia-tecnica-mundial-contra-malaria-2016-2030>
- OPS. (1988). Diagnóstico de Malaria. Washington: Organización Panamericana de la Salud.

- Pérez, H. B. (2007). El paludismo y las pruebas rápidas de diagnóstico. , 47(1). Bol Mal Salud Amb, 47(1). Obtenido de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482007000100001
- SNEM. (2008). Manual operativo estándar para la gestión del diagnóstico microscópico de Plasmodium. Ecuador. Obtenido de <https://www.orasconhu.org/documentos/ECU%20Anexo%20171%20PAMAFRO.pdf>
- WHO. (2010). Basic malaria microscopy. Part I. Learner's guide (Vol. 2). Geneva, Switzerland: World Health Organization. Recuperado el 10 de julio de 2021, de <https://www.who.int/publications/i/item/9241547820>
- WHO. (2011). Good practices for selecting and procuring rapid diagnostic tests for malaria. Geneva: World Health Organization. Obtenido de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44530>
- WHO. (2013). Meeting report of the Evidence Review Group on malaria diagnosis in low transmission settings. Geneva. Obtenido de <https://www.who.int/publications/m/item/meeting-report-of-the-evidence-review-group-on-malaria-diagnosis-in-low-transmission-settings>
- WHO. (1 de Enero de 2016). Organización Mundial de la Salud . Obtenido de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340470>
- WHO. (2020). World malaria report 2020: 20 years of global progress and challenges. World malaria report 2020. Geneva: WHO. Obtenido de <https://www.plataformalac.org/2020/11/informe-mundial-sobre-la-malaria-2020/>
- Wongsrichanalai, C. B. (2007). A Review of Malaria Diagnostic Tools: Microscopy and Rapid Diagnostic Test (RDT). Am. J. Trop. Med. Hyg, 77, 119-127. Recuperado el 2021 de Junio de 18, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1695/>

11. Anexos

Anexo A. Registro de búsqueda activa MAL-0-01

República Dominicana MSP-CENCET Informe diario del Evaluador "Búsqueda activa institucional" Form. MAL-0-01 v01-11	Cantidad de muestras tomadas por: 1. Búsqueda rutinaria _____ 2. Muestreo de contactos y colaterales _____ 3. Seguimientos de casos _____ 4. Muestras especiales _____ 5. Seguimiento de focos _____ Total de muestras tomadas: _____		RESUMEN														
			Nacionalidad				Total habitantes				Total muestras tomadas						
			Dominicanos														
			Haitianos establecidos -HE- (más de 45 días en el país)														
			Haitianos de reciente ingreso -HRI- (menos de 45 días en el país)														
		Otras nacionalidades -ON-															
Barrio o paraje: _____ Sección: _____ Municipio: _____ Provincia: _____ Fecha: _____																	
Calle y número de la casa	Nombre del jefe de familia	N° Hab.	Nombre de la persona a quien se le tomó la muestra	Apellido del jefe de familia	No. de teléfono	Edad y sexo		Si hay Embarazo: semanas	Nacionalidad				Fecha inicio de síntomas (fiebre)	N° Lamina	Tratamiento (cantidad)		Diagnóstico cuantitativo (del laboratorio)
						M	F		D	HE	HRI	ON			Cloroq.	Primaq.	
1.																	
2.																	
3.																	
4.																	
5.																	
6.																	
7.																	
8.																	
9.																	
10.																	
11.																	
12.																	
13.																	
14.																	
15.																	
Total de casas visitadas _____ Total de habitantes _____ Total de cloroquinas entregadas _____ Total de primaquinas entregadas _____ Otros medicamentos entregados _____ Si hay otras nacionalidades, diga cuales _____ Fecha de llegada al laboratorio _____ Fecha de Examen _____ Nombre del evaluador _____ Área No. _____ Nombre del Microscopista _____ Nombre del supervisor _____																	

Fuente: Elaboración propia (CECOVEZ, registro de búsqueda activa MAL-0-01)

Anexo B. Formulario de notificación pasiva (MAL-0-03) e instructivo de llenado

Form. MAL-0-03 v01-11
"Notificación pasiva"



Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
CENTRO NACIONAL DE CONTROL DE ENFERMEDADES TROPICALES
SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA
FORMULARIO DE NOTIFICACIÓN DE CASOS DE ENFERMEDADES TRANSMISIBLES BAJO VIGILANCIA ESPECIAL (MALARIA)

DATOS DEL NOTIFICADOR:

DPS O DAS de notificación _____ Fecha __/__/__ Persona que notifica _____
Centro notificador _____ Servicio _____ Teléfono _____

DATOS DEL ENFERMO:

Nombre _____ Primer apellido _____ Segundo apellido _____ Apodo _____
Nombre del padre / tutor _____ Nombre de la madre / tutora _____
Sexo: 1. Masculino 2. Femenino Fecha de nacimiento __/__/__ Edad: __ años Si es <1 año __ meses
Embarazo: 1. Sí 2. No Semanas embarazo ____ Nacionalidad: 1. Dominicana 2. Otra, especificar _____
Ocupación _____ N° de cédula _____ ARS _____ NSS _____

Dirección de residencia habitual

Provincia _____ Municipio _____ Sección _____
Barrio/paraje _____ Sub-barrio _____ Calle y N° _____
Lugar(es) de referencia(s): _____
Lugar de trabajo o colectivo _____ DPS o DAS del colectivo _____
Teléfono residencia _____ Teléfono celular _____ Teléfono del trabajo _____

DATOS DE LA ENFERMEDAD:

Nombre de la enfermedad sospechada: _____ Fecha de inicio de síntomas: __/__/__

Signos y síntomas (marcar los que correspondan)

Fiebre Debilidad Malestar general Dolor de cabeza Dolores musculares
 Escalofríos Tos Náusea o vómitos Alteración de conciencia Dolor en los ojos
 Sudoración Conjuntivitis Hepatomegalia Convulsiones Dolor de garganta
 Diarrea Erupción Esplenomegalia Dificultad respiratoria Dolores articulares
 Ictericia Prurito Dolor abdominal Otros _____

MUESTRA DE CONFIRMACIÓN:

1. Gota gruesa 2. Prueba rápida 3. Otros _____ Fecha de toma __/__/__ Código de muestra _____
Muestra tomada por: 1. Médico 2. Enfermera 3. Colaborador Voluntario 4. Evaluador 5. Supervisor
Nombre _____ N° del Puesto _____
Nombre del laboratorio _____ Fecha de recepción __/__/__ Fecha de examen __/__/__
Resultados _____ Fecha de entrega de resultados __/__/__

ATENCIÓN MÉDICA:

Atención médica: 1. Sí 2. No Fecha primera atención médica __/__/__ Centro de salud _____
Tipo de atención: 1. Ambulatorio 2. Hospitalización 3. Domicilio Provincia _____ Municipio _____
Fecha de hospitalización __/__/__ Centro de salud _____ N° de historia _____

Observaciones:

Fuente: Elaboración propia. (CECOVEZ, formulario de notificación pasiva (MAL-0-03) e instructivo de llenado)

Anexo C. Reporte de laboratorio (MAL-0-04) e instrucciones de llenado

Form. MAL-0-04 v08-19



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
CENTRO DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES
TRANSMITIDAS POR VECTORES Y ZONOSIS
REPORTE DE LABORATORIO

NOMBRE _____ EDAD _____ SEXO _____

DIRECCIÓN _____

INDICADO POR _____ CENTRO DE SALUD _____

SALA/HAB. _____ CAMA _____ FECHA DE TOMA _____ FECHA DE EXAMEN _____ HORA _____

INVESTIGACIÓN DE HEMATOZOARIOS:

1. METODO DE GOTA GRUESA:

Resultado: Positiva Negativa

Especie de *Plasmodium* _____

Densidad parasitaria: _____ / μ l de sangre
_____ / μ l de sangre

F = Trofozoitos o anillos de *Plasmodium falciparum*

Fg = Gametocitos de *Plasmodium falciparum*

2. METODO INMUNOCROMATOGRAFIA (Prueba rápida)

Resultado: Positiva Negativa

Especie de *Plasmodium* _____

Recuento por densidad parasitaria

Densidad parasitaria = ≤ 9 parásitos x 6000 leucocitos/ μ l de sangre

500 leucocitos contados

Densidad parasitaria = ≥ 10 parásitos x 6000 leucocitos/ μ l de sangre

200 leucocitos contados

Densidad parasitaria = ≥ 500 parásitos x 6000 leucocitos/ μ l de sangre

Numero de leucocitos contados

FECHA _____ EXAMINADO POR: _____ FIRMA _____

Fuente: Elaboración propia. (CECOVEZ, reporte de laboratorio (MAL-0-04) e instrucciones para llenado)

Instructivo para reporte del laboratorio MAL-0-04

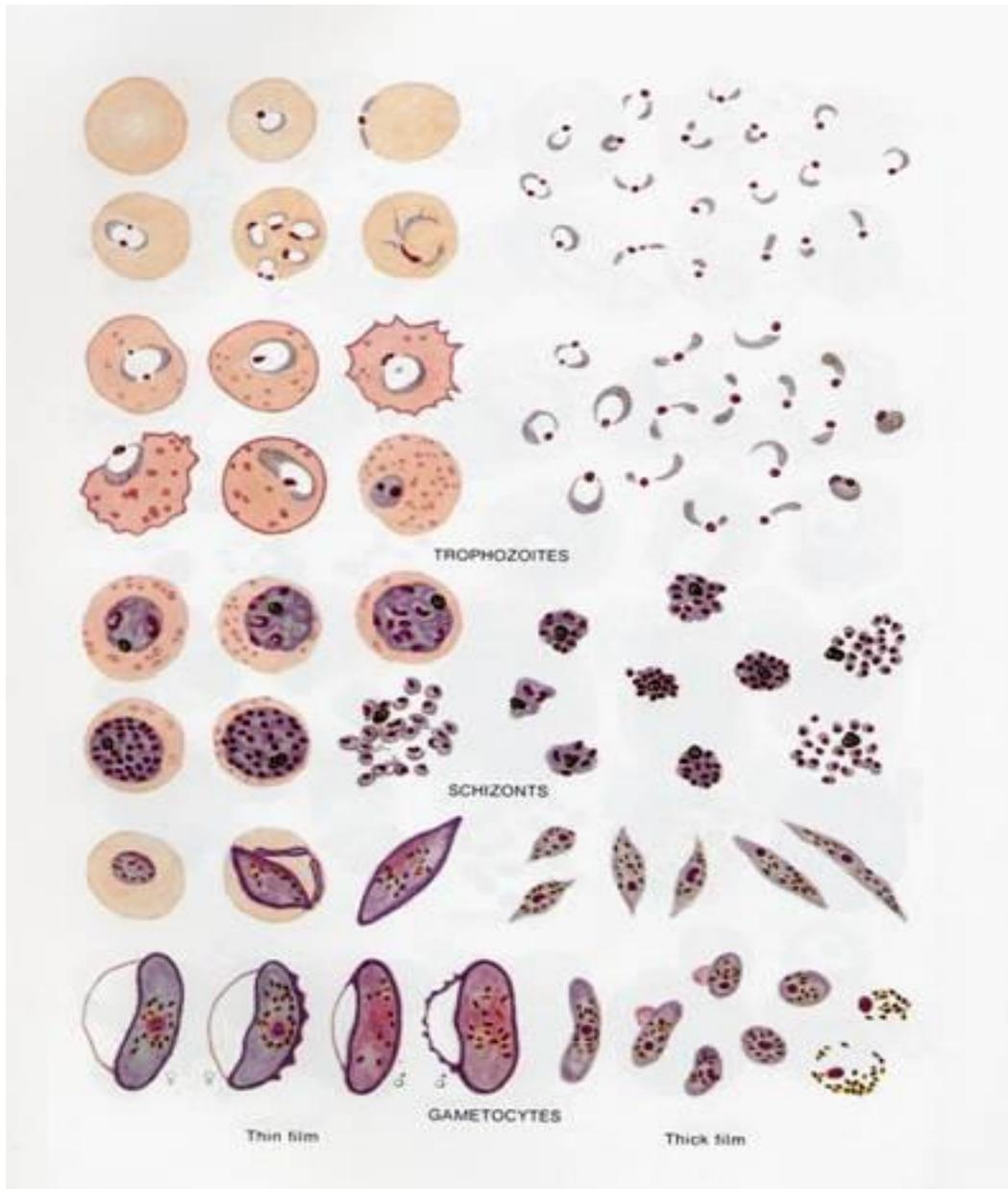
Es un instrumento de reporte que debe ser llenado por el personal de laboratorio que lee los resultados para el diagnóstico de hematozoarios. Además del encabezado que lo identifica, este formulario consta esencialmente de 2 partes: Identificación/datos generales y resultados por método de prueba. Dado el valor legal de este formulario, en la parte final del mismo se incluyen tres campos, para el registro de cuándo y quién se realizó lectura de la prueba.

Para su correcto llenado, el componente de Identificación y Datos Generales inicia con un campo situado en la parte superior derecha, donde deberá registrarse el número de la muestra o código de identificación. En la fila subsiguiente se escribe, en las rayas correspondientes, el nombre completo, la edad y el sexo del paciente. En la subsiguiente línea se escribe la dirección del paciente. A continuación, se registra qué personal de salud realizó la indicación de la prueba y el nombre del centro de salud donde labora. Completando la información anterior, en la línea subsiguiente se escribe la sala o habitación, el número de la cama, la fecha de toma de la muestra, la fecha de examen y la hora en que fue realizada la prueba.

En la sección de Investigación de Hematozoarios se identifican dos recuadros, uno para registrar los resultados de la Gota Gruesa y el otro para los de la Prueba Rápida (método inmunocromatográfico). En el recuadro de la izquierda (Gota Gruesa) se indica (mediante marca de cotejo o relleno de la casilla correspondiente) la opción que se corresponda con los resultados de la gota gruesa. En caso positivo, en la línea subsiguiente se escribe la(s) especie(s) de plasmodio(s) encontrada(s), consignando además los resultados del recuento parasitario por microlitro de sangre según corresponda. Por inmunocromatografía sólo es necesario indicar los resultados (positivos o negativos) y consignar la(s) especie(s) de plasmodio(s) encontrada(s).

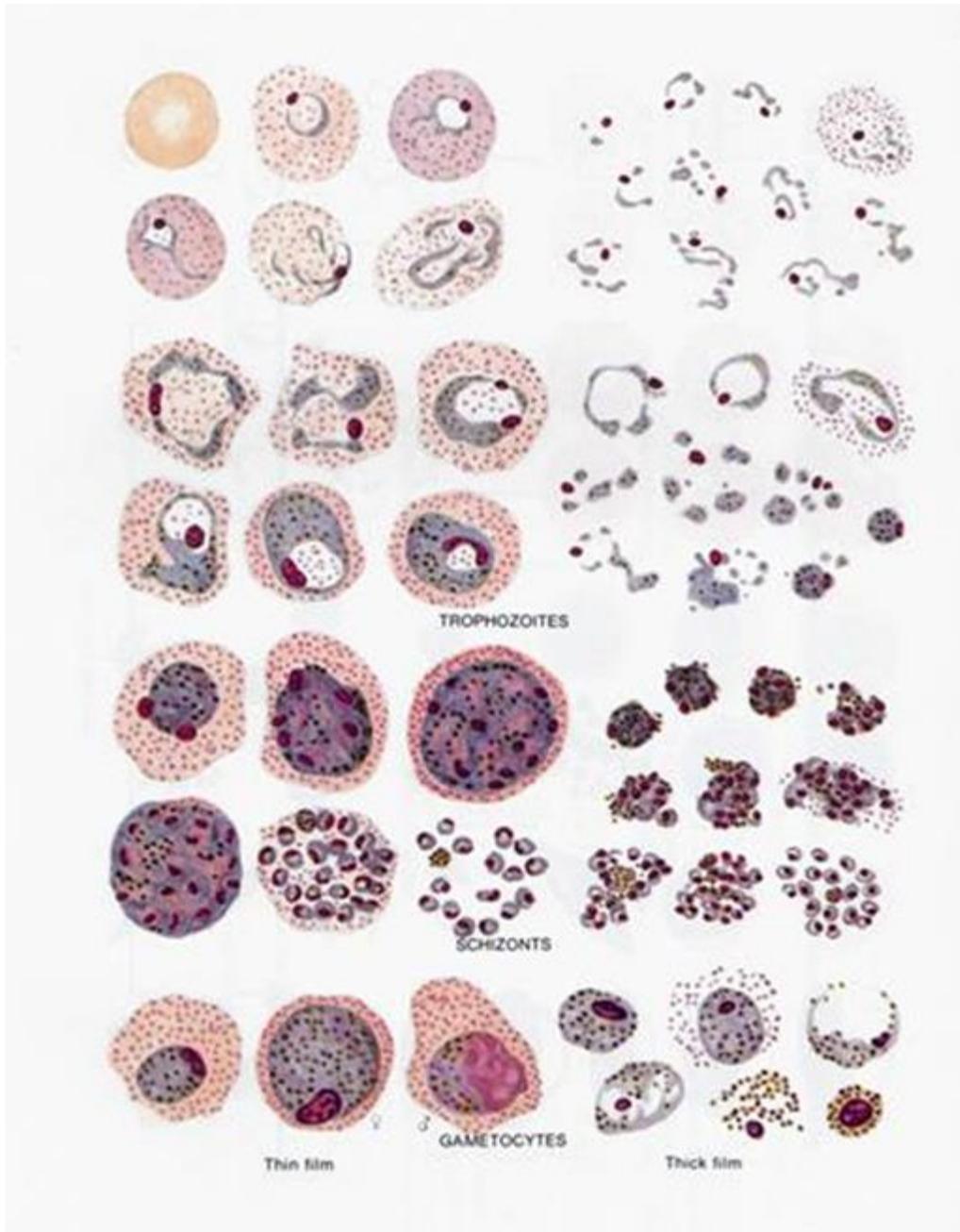
En la parte inferior del formulario se registra la fecha de realización de la prueba, por qué profesional o técnico fue examinada y esa persona debe estampar su firma. Adicionalmente, antes de la entrega, debe estamparse el sello institucional.

Anexo D. Morfología de *P. falciparum*



Fuente: (WHO, 2010)

Anexo E. Morfología de *P. vivax*



Fuente: (WHO, 2010)

Anexo F. Formulario para informe semanal de notificación de casos positivos

CANTIDAD DE MUESTRAS EXAMINADAS	CANTIDAD DE MUESTRAS POR BÚSQUEDA ACTIVA				CANTIDAD DE MUESTRAS POR BÚSQUEDA PASIVA			
	DOMINICANOS	HE	HRI	OTRAS	DOMINICANOS	HE	HRI	OTRAS

Micros copista	NOMBRE DEL PACIENTE	EDAD Y SEXO		NAC. (D, HE, HRI, ON)	FECHA INICIO DE SÍNTOMAS	FECHA TOMA	FECHA LLEGADA	FECHA EXAMEN	N.º DE LAMINA	DENSIDAD PARASITARIA	Sí hay Embarazo: semanas	LOCALIDAD DE RESIDENCIA: <u>Barrio/paraje,</u> <u>casa N.º</u> <u>Municipio,</u> <u>Provincia</u>	LOCALIDAD DE INFECCION: <u>Barrio/paraje,</u> <u>Municipio,</u> <u>Provincia, País</u>	TIPO BUSQUEDA 1. Oficial 2. Colaborador V. 3. Búsqueda rutinaria 4. Muestreo especial	NOMBRE DEL CENTRO DE SALUD (Si es búsqueda oficial)
		M	F												

Fuente: **Elaboración propia.** (CECOVEZ, formulario para informe semanal de notificación de caso positivos)



Av. Héctor Homero Hernández V., Esq. Av. Tiradentes,
Ensanche La Fe, Santo Domingo, D.N. C.P.10514
Teléfono: (809) 541-3121
www.msp.gob.do
RNC. 401-00739-8

SANTO DOMINGO REPÚBLICA DOMINICANA

