



## Diagnóstico microscópico de Paludismo

### Procedimiento Operativo Estandarizado de microscopía para Paludismo- MP-SOP-05

El presente documento fue elaborado por **Marcela Mendoza, Consultora de OPS para Paludismo**; como consecuencia de tomar conocimiento de las circunstancias y debilidades observadas respecto de la coloración; en oportunidad de la Capacitación realizada en el mes de Septiembre de 2018, en la provincia de Jujuy a personal de Laboratorios; y con el objeto de adecuar la situación a las buenas practicas y que garanticen un adecuado diagnóstico

#### 1. Objetivo y alcance.

Describir el procedimiento de diagnóstico microscópico de una muestra para el diagnóstico de Paludismo.

Este procedimiento debe ser modificado solo con la aprobación del Referente del laboratorio para la garantía de la calidad del diagnóstico microscópico de paludismo. Todos los procedimientos especificados en este documento son obligatorios para todos los responsables del diagnóstico de paludismo que trabajan en el laboratorio de referencia, laboratorios públicos y privados o laboratorios de salud básicos en instalaciones de salud que realizan microscopía de Paludismo.

#### 2. Antecedentes.

El Manejo de los pacientes con paludismo requiere un diagnóstico parasitario accesible y con calidad, junto a tratamiento antipalúdico oportuno y eficaz. Por lo tanto, para lograr intervenir realmente los casos positivos se requiere un sistema me sospeche el caso, pero también uno que lo detecte.

Es así que una vez se cuente con una muestra coloreada es necesario conocer la forma en que se debe revisar la muestra que permita identificar las especies y estadios parasitarios para determinar la densidad de parásitos, de esta forma se suministra al paciente un tratamiento eficiente, el cual debe ser monitoreado y paralelamente se activan las acciones de vigilancia a que haya lugar.

La muestra en la que se determina si una muestra es positiva o negativa es la gota gruesa por ser más sensible que el extendido, mientras este último, permite aclarar dudas en la especie parasitaria brindando mayor especificidad al diagnóstico. Sin embargo, será posible esta observación siempre y cuando el número de parásitos en la muestra permita evidenciar formas del parásito en el extendido.

Por otra parte, el extendido, también tiene utilidad para determinar la densidad parasitaria cuando la parasitemia es muy alta en gota gruesa ocasionando factor de error en el recuento o para determinar el porcentaje de glóbulos rojos parasitados.

Un parámetro del diagnóstico microscópico es el reporte de la densidad parasitaria, la cual permite estimar la intensidad de la infección, la que a su vez en la mayoría de las ocasiones se relaciona con la severidad de las



manifestaciones clínicas y consecuentemente tiene importancia pronóstica para el paciente.

Es necesaria para evaluar la eficacia del tratamiento antiparasitario monitoreando la densidad parasitaria antes, durante y después del tratamiento (1).

Es un criterio para la toma de decisión en la conducta y tratamiento inicial con el paciente, cuando se presenta una parasitemia  $\geq 100.000$  parásitos/ $\mu$ l de sangre se debe tratar el paciente como malaria complicada.

### 3. Suministros y materiales.

Se debe contar con:

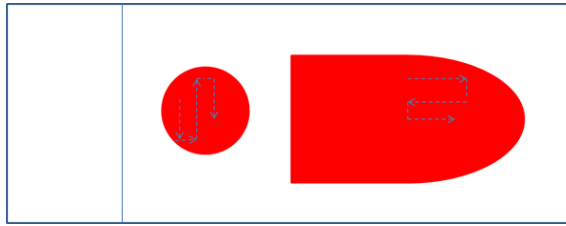
- Microscopio de luz blanca, binocular con oculares de 10x y objetivos de 10x, 40x y 100x.
- Muestras coloreadas con Giemsa.
- Aceite de inmersión índice de refracción 1,5, tipo A de alta calidad.
- Papel para limpieza de lentes.
- Lápiz de grafito y bolígrafo.
- Contador de células
- Calculadora
- Registros para el diagnóstico de paludismo o libro de registro.

### 4. Procedimiento.

#### 4.1. Examen de la gota gruesa:

1. Coloque la lámina coloreada con Giemsa en el microscopio y examine la gota gruesa con objetivo 10x.
2. Revise la muestra en búsqueda de una zona con distribución homogénea de elementos sanguíneos tenga buena coloración.
3. Mueva el portaobjetivo a una posición previa al objetivo de 100X y coloque una pequeña gota de aceite de inmersión en la gota gruesa, evitando que el aceite de inmersión no toque los objetivos secos (10x y 40X).
4. Seleccione el Objetivo de 100x y ajuste la luz del condensador. Enfoque usando el botón del micrométrico y busque campos entre 15 a 20 leucocitos en lo posible ya que de contar con muestras con menor número de leucocitos por campo es requiere de una búsqueda más extensiva.
5. Se examina la muestra sistemáticamente. Puede empezar por el lado izquierdo y seguir la búsqueda en campos microscópicos consecutivos, bien sea la búsqueda hecha verticalmente o de manera horizontal. Lo requeridos es hacer el examen de la muestra de manera ordenada procurando revisar todos los campos microscópicos (2). Ver figura 1.

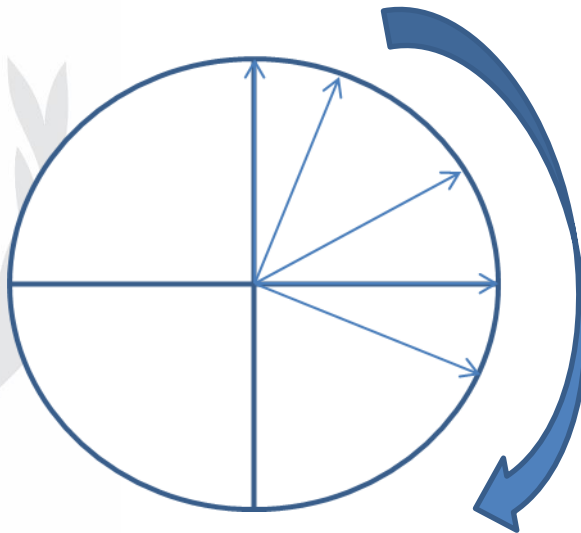
Figura 1. Revisión de gota gruesa y extendido fino



6. Para determinar que una muestra es negativa es necesario haber observado 500 campos microscópicos sin encontrar formas compatibles con *Plasmodium spp.*

7. Es necesario revisar los campos microscópicos teniendo un orden en su observación, se sigue el orden de las manecillas del reloj. Ver figura 2.

Figura 2. Forma en que se examina el campo microscópico



#### 4.2. Identificación de formas parasitarias y especie infectante

1. Si durante la observación de los campos microscópicos usando objetivo de 100X se presentan estructuras con citoplasma azul, núcleo rojizo, en ocasiones vacuola y pigmento malárico, se determina que se está frente a un parásito. Sin embargo, es necesario, buscar en más campos para observar las características de la especie infectante o si es el caso la identificación de más de una especie parasitaria (infección mixta), ver anexo 1. En las américas lo que generalmente ocurre es infección mixta por *P. vivax* y *P. falciparum*.



2. El diagnóstico microscópico cuenta con criterios para poder definir una asociación. Por lo tanto, es posible definir dos criterios:

- La infección mixta puede estar definida por la presencia de formas parasitarias de *P. vivax* y la presencia de gametocitos de *P. falciparum*, esta última especie con o sin formas asexuadas.
- Cuando no hay presencia de gametocitos de *P. falciparum*, se propone un criterio microscópico que evita sobrediagnosticar las infecciones mixtas. Ante la presencia de  $\geq 40\%$  de formas parasitarias compatibles con *P. falciparum* acompañadas de formas de *P. vivax* se da el diagnóstico de infección mixta.(3)

3. Una vez se tenga la certeza de estar frente a una mono infección o una infección mixta se procede a realizar el conteo parasitario por estadios asexuados o sexuados por especie presente.

4.3. Conteo de parásitos para establecer la densidad parasitaria en parásitos/ $\mu$ l de sangre

4.3.1. Gota gruesa:

1. Generalmente la muestra en la que se realiza el recuento es la gota gruesa. Por lo tanto, se alista el contador de células en ceros y empezando por un campo positivo en un campo ideal con 15 a 20 leucocitos/campo, se inicia el conteo de parásitos frente a los leucocitos presentes en el campo.

2. Se aplican los siguientes criterios para el conteo:

- 0 parásitos, contar hasta 500 campos microscópicos
- 1-9 parásitos, contar hasta 500 leucocitos
- $\geq 10$  parásitos, contar hasta 200 leucocitos
- Cuando el número de parásitos se presenta en altas cantidades ocasiona dificultades en el recuento, entonces se cuentan hasta 500 parásitos y el # de leucocitos serán los encontrados en estos mismos campos microscópicos.(1)

3. Por lo tanto, las fórmulas a aplicar son las siguientes

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\leq 9 \text{ parásitos} \times 6000 \text{ leucocitos}/\mu\text{l de sangre}}{500 \text{ leucocitos contados}}$$

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\geq 10 \text{ parásitos} \times 6000 \text{ leucocitos}/\mu\text{l de sangre}}{200 \text{ leucocitos contados}}$$

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

**Subdirección Provincial de Epidemiología / Ministerio de Salud**

Independencia N° 41, 1er piso \ S. S. de Jujuy - Jujuy, Argentina  
epidemiologiajujuy@gmail.com | www.msaldjujuy.gov.ar:8081  
Tel.: (0388) 4245536 | Guardia Epidemiológica: (0388) 155700536



#### 4.3.2. Extendido fino

1. Esporádicamente se requiere determinar la densidad parasitaria en extendido fino, por ejemplo, cuando la densidad parasitaria en la gota gruesa es muy alta. E aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad parasitaria} = \frac{\% \text{ de glóbulos rojos parasitados} \times 5'000.000 \text{ de glóbulos rojos} / \mu\text{l de sangre}}{100}$$

2. Para determinar adecuadamente el % de glóbulos rojos infectados, es necesario conocer el número de campos a examinar para observar 10.000 glóbulos rojos, información que se deriva de la fórmula original de densidad parasitaria en extendido fino:

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

3. Realice un recuento de glóbulos rojos en 3 campos microscópicos en la parte del extendido donde los glóbulos no estén sobre puestos. Una vez determinado el número de glóbulos rojos parasitados en 10.000 glóbulos rojos se hace la relación en 100 glóbulos rojos para obtener el dato en porcentaje.

4. Con el porcentaje de glóbulos rojos parasitados reemplace en la fórmula. 5'000.00 glóbulos rojos/ $\mu$ l corresponde a una constante que reemplaza este valor del paciente.

El porcentaje de glóbulos rojos infectados es un indicador de pronóstico del paciente que tiene la siguiente interpretación:

El 1% de glóbulos rojos parasitados corresponde a una densidad parasitaria elevada. Por arriba del  $\geq 2\%$  de glóbulos rojos parasitados es considerado una hiperparasitemia que pone en peligro la vida del paciente.

#### 4.4. Reporte del resultado

Negativo. No se observan formas parasitarias compatibles con *Plasmodium spp.*, en 500 campos microscópicos observados.

Positivo. Se deben tener presentes los siguientes parámetros.



- Se debe identificar la o las especies presentes en la muestra.
- Estadios asexuados sanguíneo (EAS) y Estadios sexuados sanguíneos (ESS).
- Densidad parasitaria por estadio observado.

## 5. Notas sobre el procedimiento.

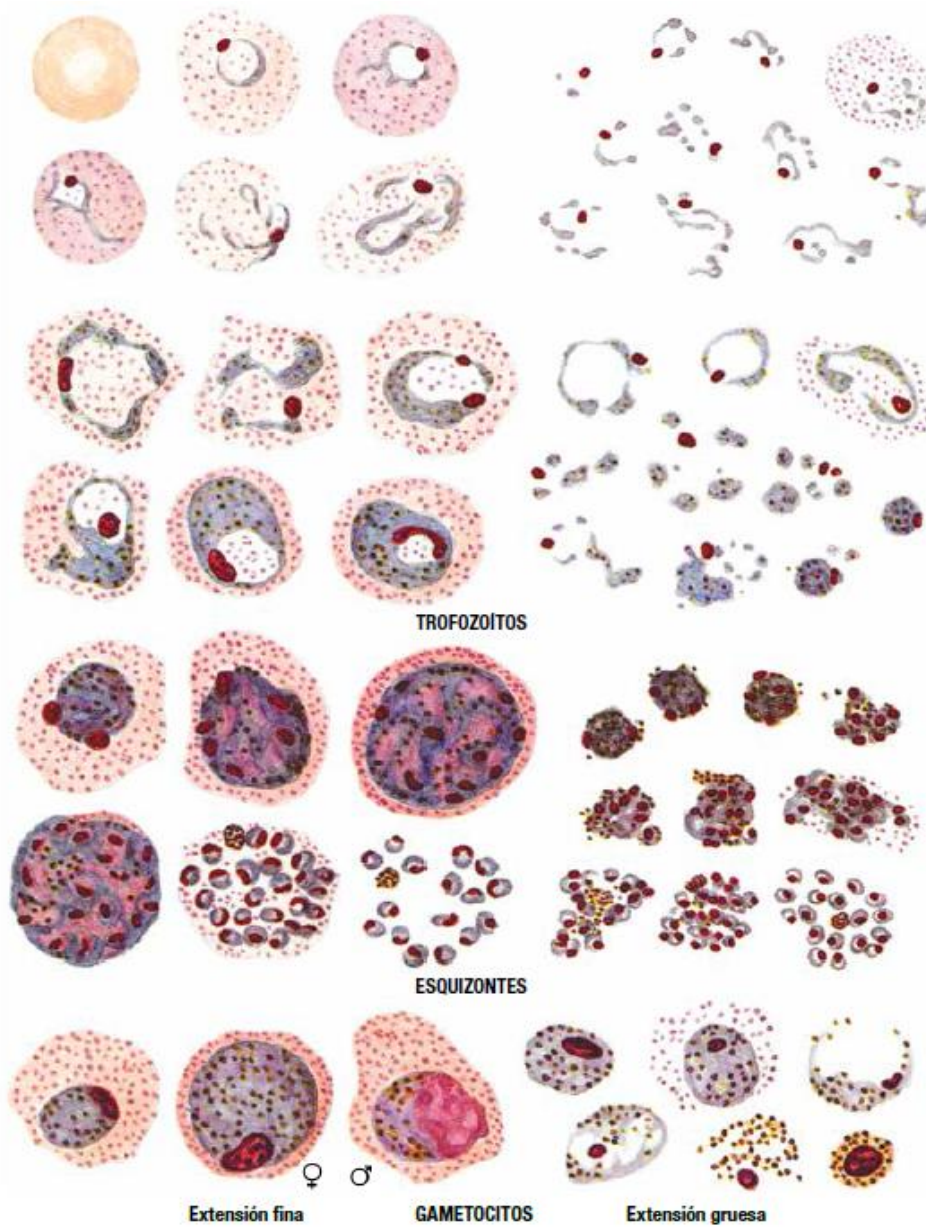
- Si la densidad parasitaria se realiza con constantes es indicado hacer los seguimientos del tratamiento utilizando las constantes. Se debe informar la densidad parasitaria para cada especie y en forma diferenciada para estadios asexuales y sexuales, expresada como EAS/ $\mu$ l y ESS / $\mu$ l.
- En caso de infecciones mixtas se reporta primero la especie con mayor densidad parasitaria y luego la subordinada.
- En caso negativo. El paludismo no se descarta con un solo resultado de microscopía negativo ya que el paciente puede tener una densidad parasitaria tan baja que no sea detectable. Por ello cuando se está examinando un paciente individual de quien se posee evidencia clínica y epidemiológica de paludismo, es necesario. realización de gota gruesa seriada, con intervalos de 8 a 12 hs por tres días.
- SEGUIMIENTO DE CASOS DE PALUDISMO. El seguimiento del paciente con infección por *P. vivax*, con toma seriada de gota gruesa y extendido hemático, observados por microscopía óptica (incluyendo recuento parasitario) para evaluar la eficacia del tratamiento (tratamiento acorde a normas nacionales), se realiza los días 1, 2, 3, 14, 21 y 28 postratamiento y 1 vez al mes durante 6 meses. El seguimiento del paciente con infección por *P. falciparum* con toma seriada de gota gruesa y extendido hemático, observados por microscopía óptica (incluyendo recuento parasitario) para evaluar la eficacia del tratamiento (tratamiento acorde a normas nacionales), se realiza los días 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 postratamiento. En caso de haber utilizado drogas de vida media prolongada (drogas que no forman parte del tratamiento acorde a normas nacionales) se adicionará una muestra a día 42.

## 6. Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Bases del diagnóstico microscópico del Paludismo. Parte I. Guía del alumno. [Internet]. Ginebra; 2014. 86 p. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9241547820/es/>
2. World Health Organization. examination of thick and thin blood films for identification of malaria parasites. Malaria Microscopy standard operating procedure-MM-SOP-08. 2016. Disponible: [http://www.wpro.who.int/mvp/lab\\_quality/2096\\_oms\\_gmp\\_sop\\_08\\_rev.pdf](http://www.wpro.who.int/mvp/lab_quality/2096_oms_gmp_sop_08_rev.pdf)
3. Espinal C, Toro G. Malaria. En: Medicina interna. Santa Fe de Bogotá: Fundación Instituto de Reumatología e Inmunología; 1998. p. 781-92.

## Anexo 1

### Morfología de *P. vivax*



Tomado de: Organización Mundial de la Salud, 2014.(1)

Subdirección Provincial de Epidemiología / Ministerio de Salud

Independencia N° 41, 1er piso \ S. S. de Jujuy - Jujuy, Argentina  
epidemiologiajujuy@gmail.com | www.msaldjujuy.gov.ar:8081

Tel.: (0388) 4245536 | Guardia Epidemiológica: (0388) 155700536

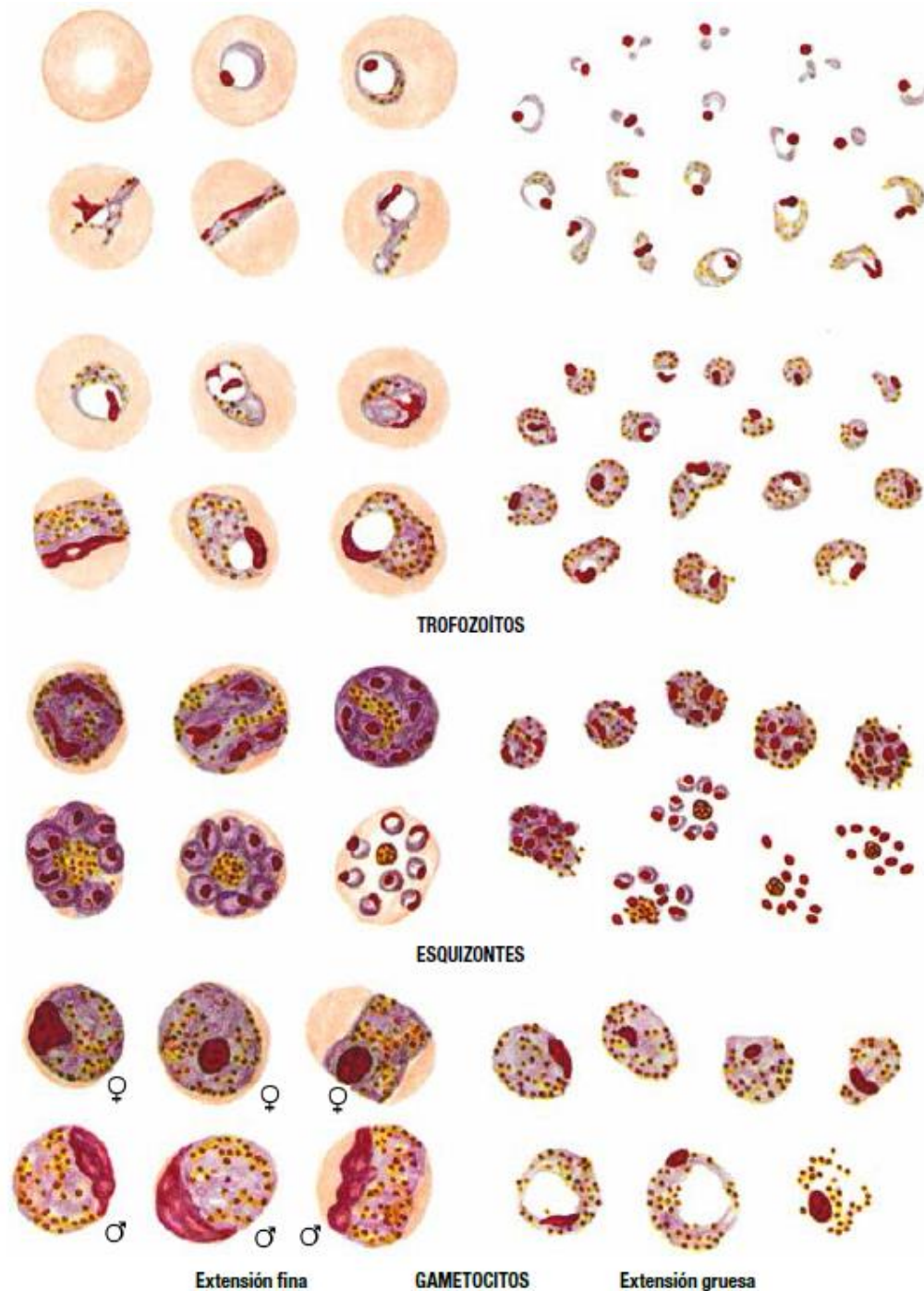
### Morfología de *P. falciparum*



Tomado de: Organización Mundial de la Salud, 2014.(1)



## Morfología de *P. malariae*



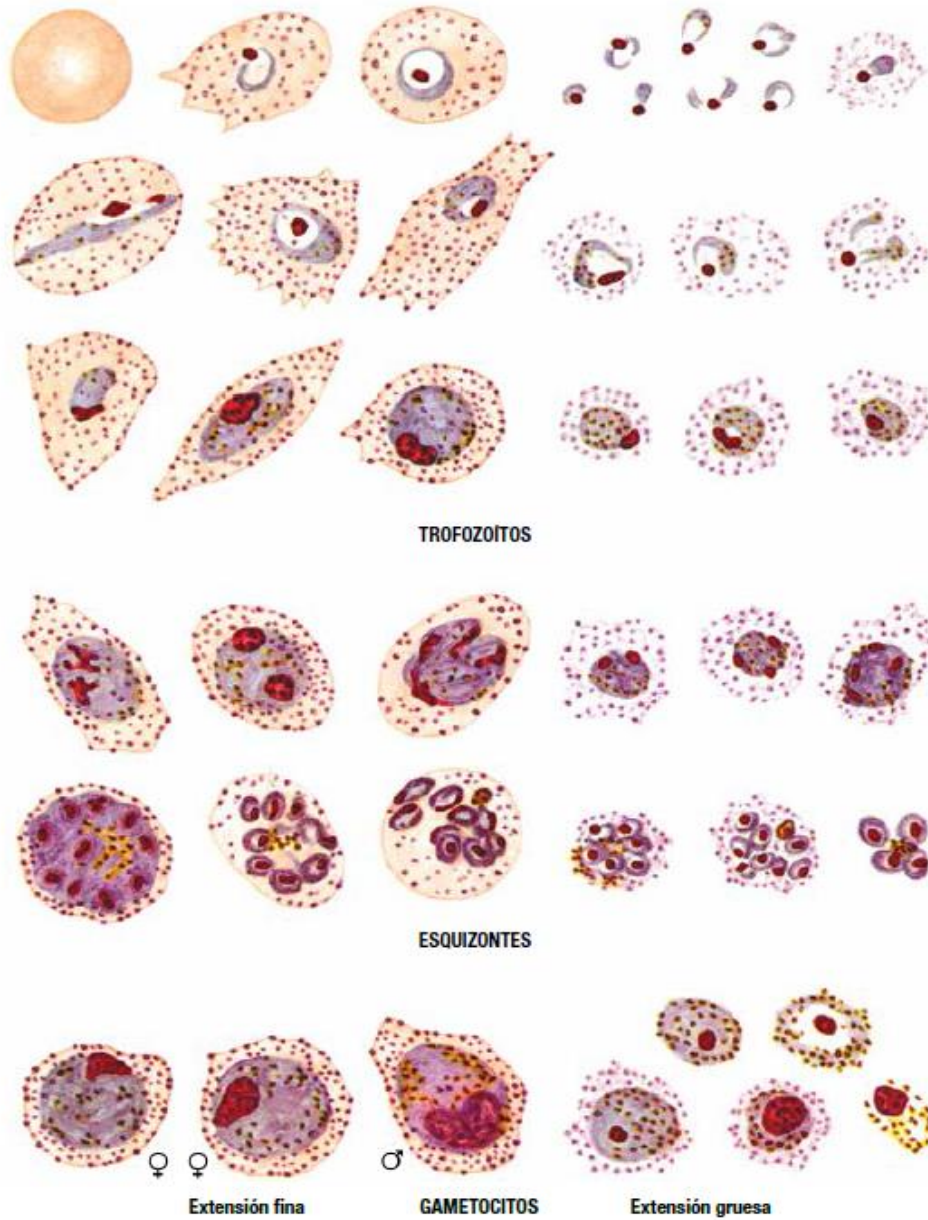
Tomado de: Organización Mundial de la Salud, 2014.(1)

Subdirección Provincial de Epidemiología / Ministerio de Salud

Independencia N° 41, 1er piso \ S. S. de Jujuy - Jujuy, Argentina  
epidemiologiajujuy@gmail.com | www.msajujuy.gov.ar:8081

Tel.: (0388) 4245536 | Guardia Epidemiológica: (0388) 155700536

### Morfología de *P. ovale*



Tomado de: Organización Mundial de la Salud, 2014.(1)

**Subdirección Provincial de Epidemiología / Ministerio de Salud**

Independencia N° 41, 1er piso \ S. S. de Jujuy - Jujuy, Argentina

epidemiologiajujuy@gmail.com | www.msaldjujuy.gov.ar:8081

Tel.: (0388) 4245536 | Guardia Epidemiológica: (0388) 155700536