

Guía para la vigilancia por laboratorio de parásitos del género *Plasmodium* spp

Resumen

Esta guía describe los lineamientos y el proceso de vigilancia por laboratorio del *Plasmodium* spp

Liliana Jazmín Cortés Cortés - Angela Patricia Guerra Vega
jcortes@ins.gov.co - aguerra@ins.gov.co



Créditos

MARTHA LUCÍA OSPINA MARTÍNEZ
Directora General

ASTRID CAROLINA FLOREZ SANCHEZ
Directora Técnica de Redes en Salud Pública

CLARA DEL PILAR ZAMBRANO HERNANDEZ
Subdirectora Laboratorio Nacional de Referencia

MARTHA STELLA AYALA SOTELO
Coordinadora Grupo de Parasitología-SLNR

©
Instituto Nacional de Salud
Bogotá, Colombia
Av. Calle 26 No. 51-20



OBJETIVOS DE LA GUÍA

Describir los fundamentos técnico-científicos de los métodos de ensayos empleados para el diagnóstico por laboratorio del *Plasmodium spp.*

Describir los criterios técnico-operativos para la participación en el programa interlaboratorio de control de calidad para la evaluación del desempeño externo directo e indirecto.

Precisar cómo se articula la red nacional de laboratorios para la vigilancia por laboratorio del *Plasmodium spp.*, así como describir las funciones y responsabilidades en cada uno de los niveles.

ALCANCE

La presente guía aplica para la vigilancia por laboratorio del *Plasmodium spp.* en diferentes matrices y métodos con los cuales se detectan en el laboratorio nacional de referencia del INS.

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

- **Diagnóstico parasitológico:** el diagnóstico de hemoparásitos se hace por el laboratorio mediante visualización directa de la especie parasitaria infectante presente en sangre (*Plasmodium spp.*, *Trypanosoma s.p.p.*, *Mansonella ozzardi*, *Babesia s.p.p.*), por medio de examen microscópico de gota gruesa y extendido de sangre como método complementario.
- **Extendido de sangre:** película delgada de sangre que se fija en una lámina portaobjeto y que sirve como herramienta complementaria del diagnóstico realizado en la gota gruesa ya que permite la observación microscópica de la morfología globular y parasitaria intacta. Puede ser teñida con cualquier colorante derivado de Romanowsky.
- **Gota gruesa:** es un examen de laboratorio para determinar microscópicamente la presencia de hemoparásitos en una muestra de sangre concentrada, la cual es coloreada con los derivados de Romanowsky y permite la identificación cualitativa y cuantitativa del parásito. La gota gruesa es el método de referencia o Gold Estándar para el diagnóstico de malaria.
- **Malaria:** es una enfermedad con manifestaciones agudas y crónicas causada por protozoarios del género *Plasmodium spp.*, de los cuales cinco especies son productoras de malaria humana en el mundo: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y recientemente *P. knowlesi*. Los parásitos del género *Plasmodium spp.* son transmitidos al humano a través de la picadura de la hembra del vector Anopheles, la cual se infecta al realizar una ingesta de sangre de un paciente infectado con gametocitos de *Plasmodium s.p.p.* El vector una vez infectado y al ingerir nuevamente sangre de un nuevo huésped, inocula esporozoitos infectantes dando inicio al ciclo de vida del parásito en el humano. La transmisión también puede ocurrir ocasionalmente por inoculación directa de glóbulos rojos infectados (transfusión sanguínea o accidente de laboratorio) y por transmisión vertical de madre a hijo. El cuadro clínico clásico consiste en escalofrío, fiebre y sudoración. El ataque agudo inicia con accesos febriles precedidos por escalofríos, seguidos de intensa sudoración, repetidos cada 48 ó 72 horas según la especie parasitaria infectante.
- **Población objeto:** el diagnóstico de hemoparásitos se debe hacer con sospecha de la enfermedad y, en general, a todos los habitantes y visitantes de zonas del territorio nacional localizadas en zonas tropicales y subtropicales consideradas de riesgo para la transmisión de estas enfermedades. Adicionalmente al laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Salud llegan láminas para confirmación diagnóstica procedentes tanto de laboratorios privados como públicos del país.

- **Prueba rápida para malaria:** (PDR) es una prueba inmunocromatográfica diseñada para el diagnóstico rápido de malaria, en la cual se detectan antígenos parasitarios específicos permitiendo diferenciar malaria por *P. falciparum* y malaria por una especie diferente de *P. falciparum*. La técnica utiliza anticuerpos monoclonales anclados a una membrana de nitrocelulosa, los cuales capturan el complejo específico antígeno-anticuerpo previamente formado.

- **Recuento parasitario:** estimación del número de parásitos/□l realizada en la gota gruesa y extendido de sangre periférica para el reporte de resultados específicamente del diagnóstico de malaria.

- **Diagnóstico molecular de malaria:** herramienta diagnóstica que se basa en la amplificación de los ácidos nucleicos de los parásitos causantes de la malaria, siendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) la técnica más comúnmente usada. El diagnóstico molecular constituye el método de detección más sensible, ventaja que ha sido de gran utilidad en la detección de infecciones sub-microscópicas.

1. GENERALIDADES

1.1 Agente etiológico

El *Plasmodium spp* es un género de protozoos parásitos perteneciente al filo Apicomplexa y la familia Plasmodiidae, causantes del paludismo o la malaria. Son parásitos intracelulares capaces de multiplicarse en el hombre, en el hepatocito (esquizogonia hepática) y, más tarde, en el eritrocito (esquizogonia sanguínea).

Las especies productoras de malaria humana son: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*. Dentro de estas especies, *P. falciparum* es la que más frecuentemente causa complicaciones y mortalidad. En Colombia las especies más frecuentes en zonas endémicas son *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*; la transmisión de *P. malariae* ocurre en focos dispersos a lo largo de la costa Pacífica, y no existe transmisión de *P. ovale*. También pueden ocurrir casos de infecciones mixtas, definidas como infecciones simultáneas por 2 especies, usualmente *P. vivax* y *P. falciparum* (1).

1.2 Modo de transmisión

Los *Plasmodium spp* son transmitidos al hombre por mosquitos hembra del género Anopheles, que estando infectados, al picar, inoculan los esporozoitos, forma infectante del parásito. La transmisión puede ocasionalmente ocurrir por inoculación directa de glóbulos rojos infectados por vía transfusional así como congénitamente y en forma casual por pinchazos con jeringas contaminadas (2).

1.3 Prevención

La prevención de las picaduras de mosquito entre el atardecer y el alba constituye la primera línea de defensa contra el paludismo. Entre las medidas destinadas a prevenir las picaduras está el uso durante la noche, de mosquiteros tratados con insecticidas de larga duración y el uso de ropa de protección y repelentes contra los insectos.

Algunos grupos de riesgo, tales como niños menores de 5 años, mujeres embarazadas y personas con inmunodepresión, deben evitar viajar a zonas con transmisión de malaria y de ser necesario el desplazamiento, tener precauciones para evitar la exposición a la picadura del vector. En caso de vivir en zonas endémicas se debe realizar la gota gruesa dentro de los exámenes prenatales y a los niños con diarrea o problemas respiratorios.

Antes de viajar a países o regiones con paludismo endémico, los viajeros deberían acudir a instituciones que ofrezcan asesoramiento a viajeros para obtener información relativa a las medidas de prevención que deberán adoptar (3).

2. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO

2.1 Bioseguridad

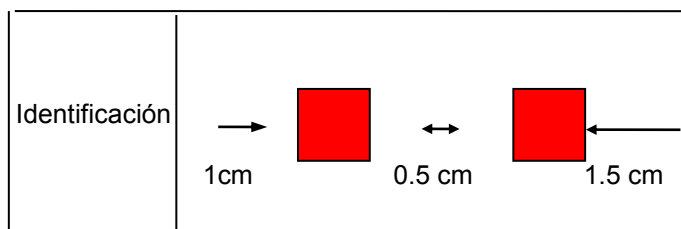
La toma de muestra debe hacerse siguiendo las normas generales de asepsia, antisepsia y bioseguridad. En caso de remisión de láminas o muestras estas deberán ser enviadas con todas las medidas de bioseguridad, utilizando el sistema de triple embalaje.

2.2. Toma de muestras

Para el diagnóstico directo de malaria se deben emplear tres (3) láminas, dos para gotas gruesas y una para el extendido de sangre periférica.

Se debe tener en cuenta que la gota gruesa debe tener la muestra de sangre extendida con movimientos de "N" para lograr formar un cuadrado de aproximadamente 1 cm x 1 cm sobre la lámina portaobjeto, con un grosor y homogeneidad adecuados y así obtener un mayor número de campos microscópicos ideales. En la misma lámina a una distancia de 0,5 cm se toma una segunda gota de sangre de la misma forma que se tomó la primera gota, como se observa en la figura No. 1 y se repite el procedimiento anteriormente indicado. Se toma la siguiente lámina para efectuar la otra gota gruesa, la elaboración de esta segunda lámina es muy importante ya que puede ser trabajada en caso de que ocurra algún accidente con la primera. Una gota gruesa ideal macroscópicamente se observa como una capa continua y única de eritrocitos que no toca el borde de la lámina.

Figura No. 1. Esquema de distribución de gotas gruesas en la lámina



Fuente: Grupo de Parasitología-LNR

Haciendo nuevamente presión en el dedo del paciente se coloca una gota de sangre en una nueva lámina a una distancia de 0,5 cm de la identificación de la misma para realizar el extendido de sangre periférica. Con la ayuda de una lámina extensora y con una inclinación de 30 - 40°, se deja extender la sangre por capilaridad por el borde de la lámina la cual se hace deslizar horizontalmente hasta levantarla al final del extendido, como se observa en la figura No. 2.

Figura No. 2: Esquema de distribución del extendido de sangre periférica en lámina

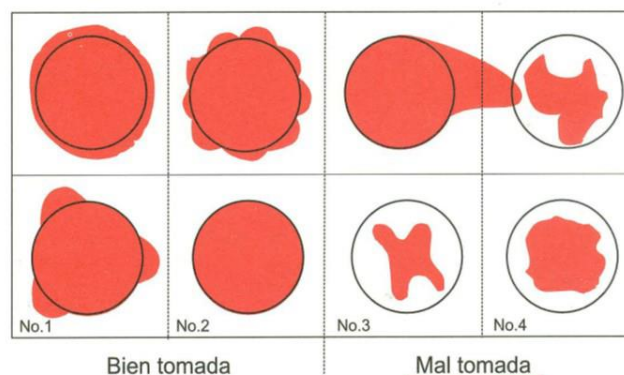


Fuente: Grupo de Parasitología-LNR

Para evitar contaminación cruzada con sangre de otros pacientes, está indicado limpiar con alcohol antiséptico la lámina con la que se realizan las gotas gruesas y el extendido. Antes de realizar la siguiente toma de muestra o extendido.

Para el diagnóstico molecular de *Plasmodium spp* tome la muestra de sangre mediante punción digital (o venosa) y deposite 4 gotas sobre el círculo de 1 cm de diámetro que está impreso en la tarjeta de papel de filtro Whatman 3M o equivalente, con lo cual se espera que el círculo quede completamente lleno. Durante la toma de la muestra no se debe tocar el papel filtro con la mano del paciente o la mano del operador. Una vez el papel filtro esté impregnado con la sangre del paciente, coloque la libreta sobre una superficie limpia y en un lugar fresco y déjela secar a temperatura ambiente por al menos 45 minutos. No esponga el papel de filtro a la luz solar directa y no permita que insectos tengan contacto con la muestra. Una vez el papel de filtro esté seco, cierre la libreta y guárdela en una bolsa plástica limpia y si es posible adiciónale un cojín de desecante. Cada libreta debe ser almacenada individualmente, es decir nunca coloque más de una libreta por bolsa. No remueva el cojín de desecante de la bolsa, pues este ayuda a eliminar la humedad del ambiente y así mantiene seca la muestra. No guarde las tarjetas en la nevera, pues éstas se humedecen y se pueden contaminar con hongos. En la figura 3 se muestra la forma correcta e incorrecta de colocar la muestra de sangre en las tarjetas de papel de filtro:

Figura No. 3. Esquema de distribución de la muestra de sangre en las tarjetas de papel de filtro



Fuente: Grupo de Parasitología-LNR

2.3. Tipo de muestra, conservación, almacenamiento y transporte

- Para hemoparásitos en lámina: Sangre capilar o sangre venosa con EDTA.
- Para pruebas moleculares: sangre impregnada en papel de filtro (4 gotas ó 200 µL) ó sangre capilar (≥ 200 µL) o venosa con anticoagulante EDTA (3 - 4 ml),
- Para pruebas rápidas: Sangre capilar o sangre venosa con EDTA.

2.4. Registro de pacientes

Con el fin de contar con la trazabilidad de la atención de los pacientes, se debe diligenciar el Registro diario de pacientes, adecuado al Sistema Integral de Calidad de cada institución (Logos) pero que tenga en cuenta todas las variables estandarizadas a nivel Nacional con el fin de poder analizar la información de manera unificada y contar con un condensado nacional desde la Vigilancia por Laboratorio, de los pacientes atendidos para el diagnóstico de malaria ya sea por microscopía o por PDR, la procedencia de los mismos, si el caso fue captado por búsqueda pasiva, activa o reactiva, el resultado del examen realizado y el tratamiento administrado de acuerdo a lineamientos vigentes. Anexo 1 y 2.

Tabla 1. Muestras para ensayos parasitológicos directos.

Tipo de muestra, conservación y transporte	Momento de toma de la muestra	Técnica a realizar
Sangre capilar obtenida por punción digital para FSP y GG, transportar las láminas a temperatura ambiente protegidas de su posible ruptura.	Cualquier momento	Frotis de Sangre Periférica (FSP) Gota Gruesa (GG) Coloreados con colorantes derivados de Romanowsky
Sangre total obtenida por venopunción en tubos con EDTA (4 mL), transportar a 4 a 8 °C con refrigerantes <i>Nota:</i> la viabilidad de los parásitos es por un periodo no mayor a 8 horas	Cualquier momento	Frotis de Sangre Periférica (FSP) Gota Gruesa (GG). Coloreados con colorantes derivados de Romanowsky o el mismo

Tabla 2. Muestras para ensayos parasitológicos indirectos

Tipo de muestra, conservación y transporte y cantidad en volumen	Momento de toma de muestra según fase de la Enfermedad	Técnica a realizar
Ensayos moleculares: Sangre obtenida por punción digital o venosa impregnada en papel de filtro (200 µl ó 4 gotas). Transportar a temperatura ambiente. Sangre total obtenida por punción venosa con anticoagulante EDTA (entre 3 a 4 mL). Transportar a 4 a 8 °C con refrigerantes	Cualquier momento	PCR anidada para detección de <i>Plasmodium spp</i>
Sangre capilar obtenida por punción digital para Pruebas rápidas de malaria (PDR), en caso de remitirse para control de calidad, transportarlas a temperatura ambiente	Cualquier momento	Prueba Rápida

Para el análisis patológico, ante el deceso es necesaria la remisión de la lámina de gota gruesa al laboratorio de parasitología del INS para su re-evaluación. De igual manera es fundamental remitir copia de la historia clínica que permita identificar la definición de malaria grave. Los hallazgos en muestras de diferentes órganos, obtenidos durante la necropsia en casos de malaria complicada que permiten aportar con la confirmación del caso son los siguientes:

- Pigmento malárico en hígado y bazo
- Granuloma malárico encefálico de Dürck
- Cambio hipóxico-isquémico cortical o edema cerebral.
- Daño alveolar difuso-DAD, edema pulmonar, microtrombos de fibrina o hemorragia alveolar.
- Necrosis hepática focal o zonal de tipo coagulativa-cambios por shock.
- Fenómenos hemorrágicos encefálicos, viscerales y del tracto gastrointestinal.

- Necrosis tubular aguda, edema glomerular, cilindros hemáticos, hialinos o granuloso, microangiopatía trombótica/ microtrombos de fibrina sugestivos de coagulación intravascular diseminada (CID). Grados variables de engrosamiento capilar glomerular.
- Hallazgos por respuesta inflamatoria en el hígado o el bazo.
- Identificación de eritrocitos parasitados.

La ausencia de pigmento malárico no excluye el diagnóstico, dado que algunas complicaciones de la malaria grave carecen de hallazgos específicos y deben ser documentadas mediante historia clínica con exámenes de laboratorio complementarios; específicamente en: acidemia/acidosis metabólica, hiperpirexia o hipotermia, deshidratación e hipoglicemia extrema y la hiperparasitemia.

2.5 Documentación requerida

En caso de solicitud de confirmación diagnóstica enviar lámina de gota gruesa del paciente junto con:

- Formato de datos básicos del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública del INS.
- Ficha epidemiológica de malaria INS: 465.
- Resultado del LSP que remite.
- Historia clínica del paciente, si se tiene disponible.

2.6 Métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico del agente etiológico

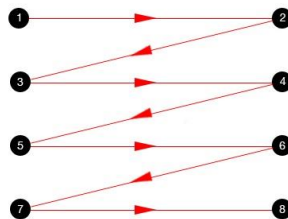
2.6.1 Examen directo a través de Gota gruesa y extendido de sangre periférica

- **Precoloración y coloración: Método de Romanowsky modificado**

Para el diagnóstico de *Plasmodium spp*, verificar que la muestra esté completamente seca para que no se desprenda; sumergir en solución de azul de metileno fosfatado por dos (2) segundos; escurrir sobre papel absorbente en posición vertical, para eliminar el exceso; enjuagar con agua amortiguadora de pH 7,2; escurrir y proceder a colorear. Para la coloración, por cada lámina a colorear, en un tubo Falcon dispensar 3 mL de agua amortiguadora, una gota de solución A y una gota de solución B, mezclar suavemente por inversión. En una lámina cóncava para coloración colocar las láminas con la muestra hacia abajo. Adicionar la solución colorante evitando la formación de burbujas y dejar actuar por 17 minutos y colocar la lámina en posición vertical para secado (4).

Para la lectura de la gota gruesa es necesario colocar una gota de aceite de inmersión sobre la muestra y enfocar al microscopio con objetivo de 100X, luego se busca un campo microscópico ideal (que contenga de 10 a 20 leucocitos) y se continúa observando los campos adyacentes de arriba abajo o de izquierda a derecha, figura No. 3.

Figura No. 4. Lectura de la gota gruesa



Fuente: Grupo de Parasitología-LNR

Confirmar la positividad o negatividad de la gota gruesa así:

- Se define una muestra negativa para hemoparásitos como la ausencia de parásitos después de observar por lo menos 300 campos microscópicos con objetivo 100x.
- Si se diagnostica una muestra positiva se debe confirmar especie o especies parasitarias (infección mixta).

Realizar el recuento parasitario teniendo en cuenta la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de parásitos X 8000}}{\text{Número de Leucocitos (200)}}$$

Si al contar 200 leucocitos se observan 10 o más parásitos, aplicar la fórmula en base a 200 leucocitos.

Si al contar 200 leucocitos se observan 9 o menos parásitos, continuar el recuento hasta llegar a los 500 leucocitos y aplicar la fórmula en base a los 500 leucocitos.

Si se cuentan más de 500 parásitos sin llegar a contar los 200 leucocitos, el recuento se dará por terminado cuando se finalice la lectura del último campo y la parasitemia debe calcularse según la fórmula anterior (4).

Para el informe de resultados del diagnóstico *Plasmodium spp* es necesario informar método de diagnóstico (Gota gruesa), positividad/negatividad de la muestra, especie parasitaria infectante y recuento parasitario en unidades parásitos/ μ L.

Positivo: se interpreta como positiva una lámina de gota gruesa en la que se observen formas parasitarias compatibles con especies de *Plasmodium spp*.

Negativo: se interpreta como negativa una lámina de gota gruesa en la que no se observen formas parasitarias compatibles con *Plasmodium spp*.

Si se diagnostica una muestra positiva se debe confirmar especie; descartar una posible Infección mixta bajo los siguientes criterios:

- Observación de formas sexuadas y asexuadas de *P. vivax*, junto con gametocitos de *P. falciparum*.
- Observación de formas sexuadas y asexuadas de *P. vivax*, junto con formas asexuadas de *P. falciparum*, en cantidades similares de las dos especies. En este caso, se realiza un recuento a 100 parásitos y se determina el porcentaje de cada especie. Para definir infección mixta debe observarse >40% de formas asexuadas de *P. falciparum*.

Si persisten dudas en la especie se debe usar el extendido de sangre para observar los cambios que ocasiona el parásito al glóbulo rojo o la morfología más definida y clara de las estructuras parasitarias.

Para el diagnóstico de parásitos del género *Plasmodium spp*, es necesario realizar gota gruesa de control al paciente al día 3 de inicio del tratamiento.

2.6.2 Diagnóstico molecular

Se llevará a cabo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por su acrónimo en inglés) usando como blanco de amplificación el gen que codifica para la subunidad ribosomal pequeña 18S del ARN ribosomal (ssrRNA 18s). La extracción del ADN del parásito se realizará a partir de una muestra de sangre impregnada en papel filtro o sangre anticoagulada mediante kit comercial, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usará una hoja de bisturí por cada muestra (papel de filtro) y simultáneamente con la extracción del ADN de las muestras, se procesará un control de extracción a partir de un círculo de papel filtro con sangre de un individuo sin malaria.

- **Detección de parásitos *P. falciparum* y *P. vivax* por PCR**

La primera reacción de PCR se realizará con iniciadores específicos para determinar género según Snounou et al. (5). Las condiciones de la mezcla de reacción son 2 mM MgCl₂, 125 μM dNTP, 0,25 μM iniciadores y 1 unidad de enzima Taq Polimerasa. El programa de amplificación consiste en una denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, anillaje a 58 °C por 2 minutos, extensión a 72 °C por 2 minutos y una denaturación a 94 °C por 1 minuto seguido por 25 ciclos a 58 °C por 2 minutos, 72 °C por 2 minutos y 94 °C por 1 minuto, con un anillaje final a 58 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Las secuencias de los iniciadores se muestran en la tabla No. 3 (5):

Tabla No. 3. Secuencias de iniciadores para la detección de género de *Plasmodium spp.*

Iniciadores para detección de género		
Iniciador		Secuencia
rPLU6	Sentido	5'- TTA AAA TTG TTG CAG TTA AAA CG -3'
rPLU5	Antisentido	5'- CCT GTT GTT GCC TTA AAC TTC -3'

La segunda reacción de PCR o PCR anidada se realizará con iniciadores específicos de especie, los cuales anillan dentro de la secuencia previamente amplificada. Las condiciones de la mezcla son 2 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, iniciadores 0,25 μM y 0,5 unidades de Taq Polimerasa. El programa del termociclador será: denaturación inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 1 minuto y 72 °C por 1 minuto. La extensión final será de 72 °C por 4 minutos. Las secuencias de los iniciadores se muestran en la tabla No. 4

Tabla 4. Secuencias de iniciadores para la detección de *P. falciparum* y *P. vivax*

Iniciadores para detección de especie			
Iniciador		Secuencia	Especie
rFAL1	Sentido	5' TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT-3'	<i>P. falciparum</i>
rFAL2	Antisentido	5' ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC-3'	
rVIV1	Sentido	5' CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC -3'	<i>P. vivax</i>
rVIV2	Antisentido	5' ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC TTA -3'	

Los productos de PCR para todas las reacciones serán resueltos por electroforesis, en gel de agarosa al 2%, teñidos con gel red y visualizados sobre luz UV. Los resultados se registrarán en un analizador de imágenes y se analizarán con el software disponible en el equipo.

Para el informe de resultados, la PCR se considera positiva cuando se visualiza una banda de ADN en el tamaño esperado, siempre y cuando los resultados del control negativo, el control de extracción y el control positivo hayan sido los esperados. El tamaño del amplicón varía de acuerdo con la especie:

- Para *P. falciparum*, con cebadores rFAL1/rFAL2 el producto de amplificación esperado es de **205 bp**.
- Para *P. vivax*, con cebadores rVIV1 y rVIV2 el producto de amplificación esperado es de **117 pb**.

El uso potencial de herramientas diagnósticas moleculares más sensibles, deberá ser considerado solo en situaciones de baja transmisión donde ya existe y está ampliamente difundido el diagnóstico y tratamiento para malaria y la tasa de prevalencia es baja (<10%). El uso de métodos diagnósticos basados en la amplificación del ácido nucleico deberá fortalecer las acciones de prevención y control de la malaria y el fortalecimiento de los servicios de salud, incluyendo el sistema de vigilancia. El programa de malaria debe considerar el uso de estas metodologías con miras al proceso de pre-eliminación en áreas con baja transmisión, investigaciones epidemiológicas y encuestas con el objetivo de mapear las infecciones submicroscópicas en áreas de baja intensidad de transmisión. Estos métodos también pueden utilizarse para la identificación de focos para medidas de intervención especiales en situaciones de eliminación (6).

El uso de técnicas moleculares también se recomienda en casos especiales como detección de infecciones submicroscópicas/asintomáticas por *Plasmodium spp*, en pacientes sintomáticos con gota gruesa negativa y/o PDR negativa con sospecha de malaria, para confirmación de malaria mixta o malaria por especies distintas a *P. falciparum* y *P. vivax* y como apoyo al control de calidad de la microscopía en situaciones discordantes (evaluación indirecta) y en la elaboración de los paneles de láminas para la evaluación externa del desempeño directa (7).

2.6.3 Pruebas rápidas para el diagnóstico de parásitos del género *Plasmodium spp*

Las pruebas rápidas se fundamentan en la detección de antígenos liberados mediante la lisis de los parásitos. Estos antígenos se unen a anticuerpos monoclonales o policlonales. La unión del antígeno y del anticuerpo migra a lo largo de una tira de nitrocelulosa y se ubica en una zona predeterminada de la tirilla en la cual se observará una línea de color violeta en caso de haber una reacción positiva, es decir, que se encuentre el antígeno de parásito.

Los usos potenciales de las pruebas rápidas para el diagnóstico de malaria pueden fortalecer la atención del paciente con malaria y serán empleadas en los siguientes casos:

- Como herramienta de diagnóstico complementaria en brotes y epidemias.
- En centros de salud o instituciones de salud, por otro personal de salud y agentes comunitarios, previamente capacitados, para ampliar cobertura y oportunidad en el diagnóstico.
- En laboratorios de salud pública (LSP) como complemento del diagnóstico microscópico y ante la duda de una de las especies de *Plasmodium spp*. observadas al microscopio.
- En regiones con población dispersa con problemas de malaria y en donde no se cuente con el diagnóstico microscópico, pero que cuente con las condiciones necesarias para mantener las características ambientales sugeridas por el fabricante de las pruebas rápidas (8).

Para garantizar la calidad del diagnóstico de parásitos del género *Plasmodium spp* mediante el uso de pruebas rápidas, es necesario capacitar al personal responsable de esta actividad en el manejo y cuidado de las mismas, las condiciones ambientales (temperatura entre 2 a 30°C) que indique el fabricante y los escenarios de posibles resultados falsos negativos, entre éstos la delección del gen *hrp2* en el parásito *P. falciparum*.

Toda adquisición de PDR debe ser sometida a control de calidad mediante paneles de sangre total en el Laboratorio Nacional de Referencia. Los estuches de pruebas rápidas que se comercialicen en Colombia

deberán contar con el registro sanitario y contar con un control de lotes con Laboratorios de Referencia de la OPS y con un “Panel Detection Score (PDS) $\geq 75\%$, de acuerdo a criterios OMS (9).

3. CONTROL DE CALIDAD

3.1 Programa de Evaluación Externa del Desempeño Directo (PEED)

El PEED para el diagnóstico de parásitos del género *Plasmodium spp*, es un ensayo de aptitud de comparación interlaboratorio de tipo simultáneo, cualitativo/cuantitativo y continuo. El PEED corresponde a la evaluación a partir de un panel de diez (10) láminas de gotas gruesas y extendidos de óptima calidad de las especies presentes en la región con infecciones mixtas de *P. falciparum* y *P. vivax* y de otros hemoparásitos denominadas “Láminas problema”, homogéneas y estables, identificadas individualmente con códigos irrepetibles; se incluyen láminas con diferentes grados de complejidad (densidad parasitaria, morfología, artefactos) y láminas negativas. Los parámetros a determinar en los ítems de ensayo son: la positividad o negatividad de las muestras, la especie o especies presentes en la muestra, la identificación morfológica de las formas sexuales y asexuadas y la densidad parasitaria en los ítems de ensayo positivos. Los paquetes son enviados por el Laboratorio Nacional de Referencia a los LSP (sin costo) y privados participantes en forma anual, para que estos últimos hagan la lectura y posteriormente, poder evaluar su desempeño. Las láminas son revisadas por un experto antes de su remisión, de tal forma que la complejidad sea similar y que la evaluación sea comparable para todos los participantes (11). Para mayor información consultar el link: <https://www.ins.gov.co/TyS/programas-de-calidad/programas-directos/parasitolog%C3%ADa>

La participación en Programas de Evaluación Externa del Desempeño, es una función de los LSP, Artículo 16, numeral 7 (Decreto 2323 de 2006); además su participación contribuye en los procesos de acreditación, al fortalecer los esquemas de aseguramiento de la calidad y el mejoramiento del desempeño analítico del laboratorio. Se evalúan los parámetros de positividad y negatividad, especie parasitaria y recuento parasitario (13).

3.2 Programa de Evaluación Externa del Desempeño Indirecto (PEID)

La Evaluación Externa Indirecta del desempeño es una actividad que contribuye a la calidad del diagnóstico en los Laboratorios de Salud Pública, razón por la que se constituye en un apoyo en la vigilancia epidemiológica de malaria. Esta evaluación aplica para los 33 Laboratorios Departamentales y el Laboratorio Distrital de Bogotá, de acuerdo con la endemividad de estos eventos.

Los municipios deberán remitir al LSP:

- 10 láminas mensuales mediante selección aleatoria (5 positivas y 5 negativas) Anexo 3.
- Los parámetros evaluados son la concordancia de resultados positivos y negativos (aceptable mayor del 75%); índice kappa general y de especie (aceptable mayor o igual a 0.8); concordancia de recuento parasitario (aceptable mayor del 75%)y error general que corresponde al porcentaje de errores técnicos.

Los LSP deberán remitir al INS:

- Todas las láminas positivas para otras especies parasitarias (*P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi*)
- Todas las láminas de infecciones mixtas
- Todas las láminas con recuento ≥ 50.000 parásitos/ μL
- Todas las láminas de pacientes que hayan fallecido con diagnóstico probable de malaria (14).

3.3. Manejo de la información.

Es indispensable implementar un sistema de archivo de la documentación asociada a los Programas de Evaluación del Desempeño, tanto la que se genera desde el Laboratorio Nacional de Referencia hacia el nivel departamental, como la que se genera del nivel departamental al municipal. También de la información recibida por los niveles departamental y municipal producto de los resultados obtenidos en el control de calidad, de tal manera que permita hacer seguimiento, a través del tiempo, del desempeño y calidad del diagnóstico, así como generar estrategias de mejora de acuerdo a los resultados obtenidos.

4. VIGILANCIA POR LABORATORIO DE *Plasmodium spp*

La vigilancia de *Plasmodium spp*, consiste en identificar y describir su circulación mediante variables relacionadas con sus características genotípicas, su estacionalidad y los sitios en donde circula con el fin de suministrar información que permita orientar las acciones de prevención primaria y secundaria así como estrategias de control.

De igual manera se definirán indicadores que permitirán resumir estos aspectos y realizar su publicación en forma periódica, a través de informes técnicos, así como en la construcción de repositorios institucionales donde fácilmente se puedan obtener los microdatos y permitir su uso por parte de la comunidad científica, médica, académica y administrativa del sistema de salud y el público en general.

<https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Informes-y-boletines-de-vigilancia-por-laboratorio-micro.aspx#InplviewHash6c8e35e2-66db-4a75-8f06-fb3c6e13971f=SortField%3DEvento-SortDir%3DAsc-WebPartID%3D%7B6C8E35E2--66DB--4A75--8F06--FB3C6E13971F%7D-FilterField1%3DTipo%255Fx0020%255Fde%255Fx0020%255Finformaci%255Fx00f3%255Fn-FilterValue1%3DInformes%2520y%2520boletines-FilterField2%3DEvento-FilterValue2%3DMALARIA>

4.1 Vigilancia parasitológica

Consiste en la identificación y caracterización de las especies circulantes en términos de especie parasitaria, formas parasitarias y recuento y la relación con el comportamiento clínico de la enfermedad y la oportunidad en el diagnóstico en los municipios del país a partir de la información generada en los registros del laboratorio y del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA). A partir de los resultados de la gota gruesa se identificará la especie parasitaria, las formas parasitarias y se realizará el recuento. De igual manera se relacionará la especie, formas parasitarias y el recuento parasitario con las complicaciones y con datos como fecha de inicio de síntomas, fecha de consulta, fecha de diagnóstico y fecha de tratamiento. Esta información la generarán todos los puestos de diagnóstico del país y será revisada por los Laboratorios de Salud Pública.

Por otro lado, el estudio de las características genotípicas, entre otras, la delección del gen *hrp2* y *hrp3* permitirá actualizar la información referente a la circulación y ubicación geográfica nacional de aislados de *P. falciparum* que no poseen estos genes. Se espera a futuro complementar la vigilancia parasitológica con datos genéticos del parásito.

4.2 Vigilancia de *Plasmodium falciparum* resistente a medicamentos antimaláricos

El propósito de la vigilancia de *Plasmodium falciparum* con mutaciones en el gen *k13* asociadas con resistencia a artemisininas es generar evidencia e información oportuna sobre la aparición de parásitos resistentes a las artemisininas y sus derivados en el país, con el fin de orientar la formulación de políticas de tratamiento antimalárico de competencia del sector salud para la prevención y control de la resistencia a los anti-palúdicos.

Esta vigilancia se realizará de forma rutinaria en todo el territorio nacional mediante la lectura de una gota gruesa al día 3 post-tratamiento. Se le explicará al paciente la necesidad de regresar al servicio de salud

a las 72 horas después de haber ingerido la primera dosis del tratamiento, para la toma de una gota gruesa, de control. Este examen permitirá hacer el seguimiento parasitológico a los pacientes diagnosticados con malaria no complicada por *P. falciparum* que hayan sido tratados con arteméter + lumefantrina. A las 72 horas post-tratamiento se espera una reducción drástica de la biomasa parasitaria, lo cual se refleja en una gota gruesa negativa (ausencia de formas asexuadas). Esta actividad la realizará el nivel local, donde el paciente es diagnosticado y tratado.

Cuando un paciente presente parasitemia asexual en la gota gruesa del día 3 post-tratamiento (gota gruesa positiva) o cuando el paciente con malaria por *P. falciparum* que acude al servicio médico sea clasificado como un caso recurrente o recrudescente, se le tomará muestra de sangre por punción venosa (sangre con anticoagulante EDTA) o punción capilar (sangre impregnada en una tarjeta de papel filtro como se explicó en el numeral 2.2. Toma de muestra) para realizar la detección de mutaciones asociadas con resistencia a artemisininas en el gen k13 de *P. falciparum*, mediante PCR y secuenciación de dicho gen. Esta actividad la realizará el Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología-SLNR.

La sangre o la tarjeta se remitirá desde el nivel local al LSP departamental o distrital y desde allí al Grupo de parasitología - LNR del INS. La solicitud del examen (Detección de *Plasmodium falciparum* con mutaciones en el gen k13 asociadas con resistencia a artemisininas) se registrará en el Sistema de Información para la Vigilancia en el Laboratorio Nacional de Referencia - SIVILAB, al igual que el resultado de la gota gruesa del día 3. El grupo de parasitología elaborará un informe anual de resultados con base en la información allegada por los LDSP.

5. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS (RNL) PARA EL EVENTO

Figura No. 5. Estructura de la Red Nacional de Laboratorios



La Red Nacional de Laboratorios es un sistema técnico gerencial cuyo objeto es la integración funcional de laboratorios nacionales de referencia, laboratorios de salud pública, laboratorios clínicos, otros laboratorios, y servicios de toma de muestras y microscopía, para el desarrollo de actividades de vigilancia en salud pública, prestación de servicios, gestión de la calidad e investigación.

El sistema de garantía de calidad del diagnóstico de malaria funciona en cabeza del Instituto Nacional de Salud (INS) desde 1995, según decreto 2323 de 2006 del Ministerio de la Protección Social de Colombia.

El Instituto Nacional de Salud (INS), Laboratorio Nacional de Referencia, como cabeza de la red de microscopía en salud pública, tiene por objetivo lograr la integración funcional de laboratorios nacionales de referencia, laboratorios de salud pública, laboratorios clínicos, servicios de toma de muestras y microscopía, para el desarrollo de la gestión de la calidad, entre otros procesos. Por otra parte, las actividades de la red cumplen con los requisitos establecidos en la normatividad ISO 17025 del 2005 numeral 5.9, referente al aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo en la cual se menciona que el laboratorio debe tener procedimientos de control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos y las calibraciones llevadas a cabo; dicho seguimiento debe ser planificado y revisado y puede incluir, entre otros, la participación en comparaciones inter laboratorios o programas de ensayo de aptitud.

La estructura de la Red de microscopía fue definida en el capítulo II del Decreto 2323 de 2006 (Estructura y funciones de la Red Nacional de Laboratorios) por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 9ª de 1979 en relación con la Red Nacional de Laboratorios y se dictan otras disposiciones. Teniendo en cuenta lo establecido en este decreto se definen los siguientes aspectos:

5.1 Integrantes de la Red Nacional de Microscopía Para la vigilancia de parásitos del género *Plasmodium spp*

- El Ministerio de Salud y Protección Social
- El Instituto Nacional de Salud, INS.
- Los laboratorios de Salud Pública Departamentales y del Distrito Capital de Bogotá.
- Los laboratorios clínicos y otros laboratorios de la red pública y privada que realicen análisis de interés para la vigilancia en salud pública
- Los Puestos de microscopía

5.2 Funciones

5.2.1 Ministerio de Salud y Protección Social

Dirigir la Red Nacional de Laboratorios y definir las políticas, programas, planes y proyectos requeridos para su adecuado funcionamiento.

5.2.2 Instituto Nacional de Salud

Es laboratorio de referencia del nivel nacional y los laboratorios departamentales de salud pública y del distrito capital lo serán en sus respectivas jurisdicciones.

El Grupo de Parasitología-RNL del INS ejercerá la coordinación de la Red Nacional de microscopía de malaria y además, de las competencias propias asignadas por ley, cumplirá las siguientes funciones:

1. Realizar asesoría y apoyo técnico al Ministerio de la Protección Social en todo lo relacionado con la red de microscopía, y de adquisición de equipos e insumos
2. Definir los estándares de calidad para el diagnóstico de malaria.

3. Supervisar el cumplimiento de dichos estándares de calidad por parte de los laboratorios de salud pública departamentales y del distrito capital.
4. Vigilar la calidad del diagnóstico de malaria de las láminas remitidas por los laboratorios de salud pública departamentales y del Distrito Capital,
5. Participar en programas de evaluación externa del desempeño con instituciones nacionales e internacionales.
6. Aplicar las normas de bioseguridad en los procedimientos de laboratorio.
7. Realizar la validación de reactivos, pruebas diagnósticas y de técnicas y procedimientos analíticos, para el diagnóstico de malaria.
8. Realizar el procesamiento de muestras para detección de mutaciones en el gen k13 de *P. falciparum*.
9. Apoyar y promover la realización de investigaciones en salud y en biomedicina según las necesidades del país y directrices dadas por el Ministerio de Salud y Protección Social.
10. Promover y realizar actividades de capacitación para el talento humano de la red de malaria,
11. Realizar transferencia tecnológica a la red de malaria.
12. Prestar asesoría y asistencia técnica a los laboratorios de salud pública en aspectos relacionados con sus competencias
13. Implementar el sistema de información para la Red de microscopía de malaria.

5.2.3 Direcciones Territoriales de Salud

Las direcciones territoriales de salud asumirán la dirección y coordinación de la red de laboratorios en el ámbito departamental o distrital, para lo cual deberán cumplir con las siguientes funciones:

1. Organizar y controlar el funcionamiento de la Red en su jurisdicción, adoptar las políticas nacionales de la Red de microscopía,
2. Establecer los objetivos, metas y estrategias de la red a nivel departamental o distrital, verificar el cumplimiento de los estándares de calidad de los laboratorios y puestos de microscopía,
3. Brindar asistencia técnica a los laboratorios de su área de influencia,
4. Promover y realizar actividades de capacitación en temas de interés para los integrantes de la red según las necesidades.
5. Garantizar la infraestructura, equipos, insumos y el talento humano necesario para el manejo de la información del Laboratorio de Salud Pública y en general para el funcionamiento de la Red de microscopía en su jurisdicción.

5.2.4 Laboratorios de Salud Pública Departamentales y del Distrito Capital (LSP)

Los laboratorios de salud pública departamentales y del Distrito Capital, como laboratorios de referencia en su jurisdicción, serán los actores intermedios de articulación en el área de su competencia entre el nivel nacional y municipal y tendrán las siguientes funciones:

1. Adoptar e implementar el sistema de información para la Red de microscopía establecido por el nivel nacional en los temas de su competencia.
2. Adoptar e implementar en su jurisdicción el sistema de monitoreo y evaluación (certificación) de la Red de microscopía acorde con los lineamientos del Ministerio de la Protección Social.
3. Implementar el sistema de gestión de la calidad para garantizar la oportunidad, confiabilidad y veracidad del diagnóstico de malaria.
4. Participar en los programas nacionales de evaluación externa del desempeño y desarrollar programas de evaluación externa del desempeño a nivel municipal.
5. Vigilar la calidad del diagnóstico de malaria, consolidar y enviar mensualmente al INS todas las muestras recolectadas en papel filtro que reciban de los diferentes laboratorios que se encuentren bajo su jurisdicción para análisis molecular (gen k13) con la respectiva documentación,
6. Implementar los programas de bioseguridad y manejo de residuos, de acuerdo con la normatividad nacional vigente,
7. Cumplir con los estándares de calidad y bioseguridad definidos en la Resolución 1619 de 2015
8. Apoyar la investigación y control de brotes, epidemias y emergencias.

9. Brindar capacitación y asistencia técnica a los municipios y a otras entidades,
10. Participar en el sistema de referencia y contra-referencia de muestras biológicas.

5.2.5 Red de microscopía en el nivel municipal

Los laboratorios públicos y privados de la jurisdicción municipal y redes de microscopistas, tendrán las siguientes funciones:

1. Desarrollar la gestión para su integración funcional a la Red Nacional de microscopía.
2. Apoyar a la entidad territorial en la realización de pruebas de laboratorio, según su capacidad y área de especialización.
3. Adoptar las directrices nacionales y territoriales que permitan su articulación al Sistema de Vigilancia en Salud Pública y su participación en el sistema de información para la Red de microscopía.
4. Informar de manera obligatoria y oportuna a la Dirección Local de Salud, los datos y resultados de pruebas de laboratorio de interés en salud pública a los interesados para la toma de decisiones.
5. Participar en los programas de evaluación externa del desempeño directa e indirecta
6. Cumplir con los estándares de calidad y bioseguridad definidos.
7. Prestar los servicios de toma de muestra incluida la toma de muestra de sangre por punción digital (pulpejo del dedo) o venopunción en una hoja de papel filtro de los pacientes que presenten gota gruesa positiva al día 3 post-tratamiento con Coartem y envío de estas tarjetas al LSP.
8. Realizar el procesamiento, análisis e informe de resultados de laboratorio de manera oportuna, eficiente y confiable.
9. Participar en el sistema de referencia y contra-referencia de muestras biológicas.
10. Los servicios de toma de muestras y los puestos de microscopía deberán adoptar y cumplir con los estándares de calidad de acuerdo con la complejidad del servicio que prestan, bajo la supervisión y monitoreo de laboratorios departamentales (12).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chaparro-Narvaez PE, Lopez-Perez M, Rengifo LM, Padilla J, Herrera S, Arévalo-Herrera M. Clinical and epidemiological aspects of complicated malaria in Colombia, 2007–2013. *Malar J.* 2016;15 (1):269. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-016-1323-5>
2. Alano P. The emerging role of the human bone marrow as a privileged developmental niche for the transmission stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Ann Ist Super Sanita.* 2017; 53:96-99. Disponible en: http://dx.doi:10.4415/ANN_17_02_03
3. Organización Mundial de la Salud. Paludismo: información para viajeros. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2017. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/travellers/es>
4. Instituto Nacional de Salud, Fondo Mundial, MCP. Manual para el diagnóstico de malaria no complicada en puestos de diagnóstico y tratamiento, 2015. ISBN: 978-958-13-0175-1
5. Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W, Pinheiro L, do Rosario VE, Thaitong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Mol Biochem Parasitol.* 1993; 61:315-20
6. Organización Mundial de la Salud. Política recomendada por la OMS para el diagnóstico de la malaria en situaciones de baja transmisión. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2014. Disponible en: <http://www.usaidami.org/extras/recomendadaporlaOMS.pdf>

7. Organización Mundial de la Salud. Política recomendada por la OMS para el diagnóstico de la malaria en zonas de baja transmisión. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2014 Disponible en: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria-diagnosis-low-transmission-settings-sep2014.pdf>
8. Organización Mundial de la Salud. Acción e inversión para malaria 2016-2030. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2015. ISBN 978 92 4 150897 1. Disponible en: http://rollbackmalaria.org/wp-content/uploads/2017/09/RBM_AIM_Report_A4_EN-Sept2015-ORG.pdf
9. World Health Organization. Malaria Rapid Diagnostic Test Performance. WHO; 2018. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/276190/9789241514965-eng.pdf?ua=1>
10. Organización Panamericana de la Salud. Memorias Taller de Capacitación y Certificación de microscopistas para países de la región de las Américas. México, D.F.: Organización Panamericana de la Salud; 2016
11. Instituto Nacional de Salud. Protocolo Programas Evaluación del Desempeño. Bogotá. Instituto Nacional de Salud. 2016.
Disponible en: <http://www.ins.gov.co/tramites-y-servicios/programas-de-calidad/Paginas/parasitologia.aspx>
12. Ministerio de la Protección Social. Decreto 2323 de 2006 Malaria. Bogotá, D.C.: Ministerio de la protección Social; 2006
13. Instituto Nacional de Salud. Programas de Evaluación Externa del Desempeño. PEED Parasitología – Malaria. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2015
14. WHO. Malaria microscopy quality assurance manual. Manila: Geneva: World Health Organization; 2009. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204266/1/9789241549394_eng.pdf

ANEXO 2. DICCIONARIO DE VARIABLES

No de Orden: Consecutivo de atención en el mes de acuerdo a orden de llegada.

Fecha toma Muestra: día/mes/año

Nombres y Apellidos del paciente: como aparece en el documento de identificación

Tipo Documento: CC (cédula) TI (tarjeta de identidad) RC (registro civil) CE (cédula extranjera) MS (menor sin identificar) AS (adulto sin identificar)

Número Identificación: como aparece en el documento de identificación

Sexo (M/F): M (masculino) F (femenino)

Edad (años): años cumplidos

Emb. (S/N): Mujer embarazada Sí o No

Procedencia: Sitio donde reside por lo menos los últimos 15 días

Número Telefónico: donde se pueda ubicar a la persona

Búsqueda (A, P, R): A (Activa), P (pasiva) R (reactiva)

Tipo de Caso (N/R): N (nuevo) R (recrudescencia)

Tipo Examen (GG/PDR): GG (gota gruesa) PDR (Prueba de diagnóstico rápido)

Resultado: Marcar con X: Negativo Positivo; Especie: P. vivax, P. falciparum, infección mixta; Recuento p/uL: parásitos/uL de sangre

Tratamiento: Fecha Inicio día/mes/año

Cloroquina 250 mg (150 mg base) (Número de Tabletas)

Primaquina Marcar con X: 5 mg 15 mg (Número de Tabletas)

Arteméter + Lumefrantrina: Art 20 mg + Lum 120 mg (Número de Tabletas)



