

**MANUAL PARA EL
DIAGNOSTICO MICROSCOPICO
DE LA
MALARIA**

SEGUNDA EDICIÓN



ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

1965

INDEXED

MANUAL PARA EL
DIAGNOSTICO MICROSCOPICO
DE LA
MALARIA

SEGUNDA EDICIÓN



Publicaciones Científicas No. 87

Febrero de 1965

ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD
Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD
1501 New Hampshire Avenue, N. W.
Washington, D. C. 20036, E.U.A.

Preparado por el

DR. A. J. WALKER

Consultor en Parasitología

Programa de Erradicación de la Malaria

SUMARIO DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN	v
--------------------	---

Parte I. El parásito de la malaria

1. El ciclo de vida del parásito de la malaria.....	3
2. El comportamiento de las infecciones por <i>P. falciparum</i> y <i>P. vivax</i> en el hígado del hombre.....	5
3. La sangre en relación con el diagnóstico de la malaria... ..	11
4. Comportamiento general de las distintas especies de <i>Plasmodium</i> en la sangre periférica.....	16
5. Características individuales de las especies en la sangre periférica	19

Parte II. Preparación de portaobjetos

6. Preparaciones de gotas gruesas.....	35
7. Teoría de la coloración de la sangre.....	38
8. Técnicas de coloración en general.....	43
9. Tratamiento previo de gotas gruesas.....	46
10. Técnicas de coloración—Detalles.....	47

Parte III. Examen microscópico

11. Microscopios	55
12. Iluminación	59
13. Técnica del examen microscópico.....	65
14. Registro y notificación de los resultados.....	68
15. Procedimientos generales sugeridos para el examen ordenado de láminas coloreadas.....	70
16. Portaobjetos	71

Parte IV. Servicios de laboratorio

17. Servicios de laboratorio.....	87
18. Equipo	89

Apéndices:

<i>Los diez "pecados mortales" en la microscopia de la gota gruesa...</i>	96
1. La microscopia de la erradicación de la malaria.....	97
2. El comportamiento de los gametocitos del <i>P. falciparum</i> ...	99
3. Glóbulos rojos en forma de rosca.....	100
4. Descripciones diagramáticas de los parásitos observados....	101
5. Modelos o guías	103
6. El fenómeno de la coloración de Schüffner.....	104
7. Prueba rápida de la calidad del colorante de Giemsa líquido.	105
8. La técnica de la coloración salina de Shute.....	105
9. La coloración de frotis.....	106
10. Recoloración de gotas gruesas de sangre.....	108
11. Biblioteca de portaobjetos para la enseñanza.....	110
12. Cuentagotas de plástico	112
13. Lápices usados para hacer marcas en la sangre.....	112
14. "Humigraph"	113
15. Forma de ajustar el tornillo macrométrico del microscopio..	114
16. El empleo de objetivos marcadores.....	115
17. Aceite de inmersión	117
18. Tipos de lámparas de microscopio.....	119
19. Pera de goma	120
20. Termómetro de máxima y mínima.....	121
21. Fotómetro "Photovolt"	122
22. Inspección continua del equipo de microscopia.....	123
23. Definiciones	124

INTRODUCCION

Este Manual ha sido preparado con la finalidad principal de dar uniformidad a las técnicas de laboratorio usadas para el diagnóstico microscópico de la malaria en los programas de erradicación de esta enfermedad. Tiene por objeto también, contribuir a la enseñanza de la parasitología en los centros de adiestramiento para la erradicación de la malaria patrocinados por la OSP/OMS o que funcionan con su colaboración. Además, facilitará el trabajo de los técnicos de laboratorio en los exámenes corrientes de láminas de sangre, en especial de las negativas, que serán la mayoría una vez pasadas las primeras etapas de la erradicación.

En esta segunda edición, el contenido se ha reagrupado en cuatro capítulos principales: El parásito de la malaria; La preparación de portaobjetos; Examen microscópico, y Servicios de laboratorio. En 23 Apéndices se ha agregado información complementaria sobre equipo y técnicas esenciales a fin de proporcionar al estudiante una fuente fácil de referencia.

Las técnicas que se recomiendan son sencillas y se basan en el examen de una gota gruesa de sangre convenientemente preparada. El resultado de la utilización de las técnicas indicadas se traducirá no sólo en un diagnóstico rápido y de alta calidad, sino también en un aumento en la producción del trabajo diario del microscopista.

Los principios y recomendaciones que contiene este Manual, redactado con la mayor sencillez, permiten su aplicación a cualquier programa de erradicación de la malaria.

PARTE I

El parásito de la malaria

I. EL CICLO DE VIDA DEL PARASITO DE LA MALARIA

Un medio auxiliar práctico de adiestramiento que puede emplearse conjuntamente con este Manual es la película en colores titulada *Ciclo de vida del parásito de la malaria*, editada por el Profesor H. E. Shortt y distribuida en inglés y español por la Imperial Chemical Industries. Dicha película presenta en forma clara y esquemática el ciclo de vida del *Plasmodium* en el mosquito y en el hombre. La última parte, en la que se muestra el diagnóstico de malaria por *P. vivax* mediante frotis o extendidos, puede suprimirse ya que no tiene ningún valor desde el punto de vista de los principios básicos empleados en este Manual.

Otro medio auxiliar es la película corta en blanco y negro en inglés (Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América, No. M-138B, Centro de Enfermedades Transmisibles, Atlanta, Georgia), en la que se ha captado cinematográficamente a un mosquito en el acto de picar a un hámster en la cabeza. Hacia el final de esta película, tomada con fotomicroscopia, se muestra la exflagelación del gametocito macho y la fertilización del gametocito hembra por uno de los microgametos. Esta gota de sangre gruesa, que se seca muy lentamente en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, permite demostrar la exflagelación parcial y aun completa. Este es el aspecto de mayor importancia para el diagnóstico presentado en esta película.

La necesidad de obtener sangre para madurar los huevos ya fertilizados es lo que induce al mosquito anofeles hembra a picar a un animal de sangre caliente. Si ese animal es un hombre que padece una infección bien definida de alguna de las especies maláricas, la sangre contendrá formas sexuales del parásito, así como formas asexuales que son las causantes de los síntomas de la enfermedad.

Estas últimas, al llegar al estómago del mosquito, mueren rápidamente y son digeridas, pero las primeras—los gametocitos—escapan de los correspondientes glóbulos rojos humanos ingeridos por el mosquito. El gametocito macho más pequeño rápidamente pro-

duce elementos espermatozoides móviles llamados microgametos (exflagelación), que se desprenden de su núcleo y se mueven activamente en el líquido del estómago del mosquito. El gametocito hembra más grande sufre un proceso de maduración que capacita a un microgameto móvil a entrar y moverse activamente dentro del citoplasma del macrogameto.

En unas cuantas horas, un oocineto fertilizado se desarrolla y se introduce entre las células de revestimiento del estómago del mosquito, viniendo a descansar bajo la membrana que separa las células de revestimiento de la cavidad del cuerpo del mosquito. Aquí el material nuclear unido comienza a multiplicarse en la célula grande, altamente refringente, que aún conserva el pigmento original del gametocito hembra. El oocineto enquistado, convertido ahora en un ooquiste esférico, comienza a crecer más y más, penetrando más adelante en la cavidad alrededor del tracto intestinal del mosquito. Después de dos o tres semanas el ooquiste, dilatado por miles de cuerpos diminutos como vellos, llamados esporozoitos, conteniendo cada uno un pequeño trozo de cromatina, se revienta descargando los esporozoitos maduros en la cavidad, llena de fluido, del mosquito. La corriente de fluido del cuerpo conduce los esporozoitos al tórax del mosquito. Una vez en contacto con las células de las glándulas salivales, penetran en ellas y por último llegan a los conductos salivales con la saliva.

La película del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos sobre el mosquito en el acto de alimentarse, demuestra que la proboscis sondea repetidamente la piel de su víctima hasta que llega al lumen de un capilar o vena. Durante las operaciones de picar y absorber, el mosquito expulsa saliva y los esporozoitos de la malaria son inyectados en la víctima intravascularmente, como lo haría una aguja en una vena. Por subinoculación, estos se pueden ver circulando hasta 10 minutos, y, raras veces, durante más de 30 minutos. Puesto que toda la sangre del cuerpo humano pasa a través del hígado cada tres minutos, es relativamente fácil que muchos esporozoitos penetren en las células del hígado, adyacentes a los sinusoides llenos de sangre. Indudablemente muchos son atrapados por los fagocitos; pero aquellos que logran su objeto comienzan a multiplicarse inmediatamente en el hígado, y este proceso dura 6, 8, 9 u 11 días completos, según la especie de plasmodio. La forma creciente en el citoplasma de las células del hígado se extiende y su núcleo se divide repetidamente hasta que se rompe el esquizonto maduro, grande, de forma irregular. Numerosos merozoitos

del hígado que resultan de esta ruptura se abren paso entre las células vecinas hasta el sinusoide más cercano que contenga las células rojas. De este modo, la fase pre-eritrocítica termina, y comienza la fase eritrocítica, que produce la enfermedad. Al final del período de 48 ó 72 horas, muchos esquizontos eritrocíticos maduros se revientan y grupos de pequeñísimos merozoitos se apresuran a penetrar en otros glóbulos rojos, antes de ser capturados por los monocitos fagocíticos y otras células.

2. EL COMPORTAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR *P. FALCIPARUM* Y *P. VIVAX* EN EL HIGADO DEL HOMBRE

Después de que las fases exoeritrocíticas del *Plasmodium* se descubrieron por primera vez en el endotelio de las aves, se supuso durante mucho tiempo que esas fases se producirían en el mismo lugar en el hombre; pero no ha sido así. Varios años antes de que se descubrieran las fases hepáticas presentadas esquemáticamente en la película *Ciclo de vida del parásito de la malaria* (véase pág. 3), se habían realizado experimentos en Australia, durante la Segunda Guerra Mundial, con el fin de conocer exactamente el efecto producido por la entonces bien conocida droga atebrina en el tratamiento de la malaria. Los resultados de dichos experimentos demostraron en forma concluyente y completa las fases exoeritrocíticas del *P. falciparum* y el *P. vivax* en el hombre.

Dichos experimentos habían sido tan completos y minuciosos que sólo quedaba por descubrir en qué lugar se producían esas fases. Se utilizó un número ilimitado de voluntarios no inmunes, en un área donde no existía malaria. Se trajeron mosquitos y cepas de *P. vivax* y *P. falciparum* de áreas hiperendémicas de la región del Pacífico Sudoccidental. Se empleó la subinoculación de 300 a 500 cc de sangre para demostrar la presencia o ausencia de formas infectivas en la circulación periférica. Este fue el aspecto más destacado de las pruebas, ya que hasta esa época se habían inoculado solamente de 10 a 50 cc a un número muy reducido de personas.

Los resultados obtenidos se pueden resumir en los siguientes términos:

P. falciparum. Se permitió que mosquitos con esporozoitos demostrables de *falciparum* picaran en el brazo derecho de un voluntario mientras, simultáneamente, se extraían de 300 a 800 cc de sangre de una vena del brazo izquierdo y se inyectaban inmediatamente a otro voluntario. Ambos desarrollaron parasitemia y síntomas al final del período corriente de incubación, de 11 días. Sin embargo, una muestra similar de sangre, extraída media hora o más después de haber cesado de alimentarse los mosquitos, no infectó en ningún caso al segundo individuo. Ulteriormente, ni la sangre extraída e inyectada diariamente durante 5 días produjo signo alguno de enfermedad en aquéllos. En realidad, no se informó de que hubiera dado resultado positivo ninguna subinoculación hasta después de transcurridas 144 horas. Esto significa que transcurrió un período de 6¹ días completos antes de que la sangre de la persona que sufrió la picadura pudiera inducir una infección demostrable en otro individuo.

Las subinoculaciones diarias continuaron siendo positivas en el segundo individuo hasta que ingirió una dosis de atebriña suficiente para su curación o desarrolló inmunidad adecuada para la curación espontánea. Una vez que algunos de estos casos llegaban a ser negativos continuaban así, pero todos fueron observados durante un año.

Por otra parte, se obtenían siempre reacciones positivas de las subinoculaciones semanales de aquellos casos que habían recibido medicamentos insuficientes, aunque continuaban libres de síntomas por varias semanas o meses antes de la recaída.

Esto demostró de manera concluyente que existía un período bien definido de 6 días completos, durante los cuales continuaba, fuera de la circulación periférica, cierto tipo de desarrollo de la infección por *falciparum*.

Se demostró repetidamente que un individuo que recibía diariamente 100 mg de atebriña, desde siete días antes de las picaduras de mosquitos infectados con *falciparum* y ulteriormente durante un mínimo de 3 semanas, jamás desarrollaba parasitemia o síntomas visibles, aunque las subinoculaciones hechas del 9° al 13° día resultaban de vez en cuando positivas. Esta fue la primera prueba experimental de que una droga podía eliminar por completo la infección por *falciparum*. Se demostró igualmente que 3 tabletas

¹ *falciparum*—6 días; *vivax*—8 días; *ovale*—9 días; *malariae*—11 días.

de atebрина, de 100 mg, administradas diariamente durante 8 días, podían también producir una curación radical de la infección con esta especie.

Aunque se logró curar algunos casos individuales, no se podía confiar en la quinina para la curación de la malaria por *falciparum*, en más del 50% de los casos. El desarrollo de un alto grado de inmunidad quizá haya contribuido al éxito notificado. Prueba de la exactitud de esta observación es la virtual desaparición de la fiebre hemoglobinúrica en aquellas regiones donde la atebрина sustituyó a la quinina, para la supresión y el tratamiento.

P. vivax. Con el *vivax* se repitieron experimentos semejantes, obteniéndose el mismo éxito, pero con resultados notablemente diferentes. Las subinoculaciones con *vivax* resultaron negativas tanto el 7° como el 8° día. Hasta que transcurrieron 8 días completos no se manifestó la infección, ni aun en los casos de individuos sometidos simultáneamente a la picadura de mosquitos infectados con *vivax* y mosquitos infectados con *falciparum*. La infección de *falciparum* se manifestó al 7° y 8° día; al 9° día aparecieron ambas infecciones.

La sangre de la persona infectada con *vivax* continuó siendo positiva durante todo el ataque primario de 3 a 5 semanas de duración o hasta que se instituyó tratamiento curativo. Se transformó entonces en negativa y las subinoculaciones semanales, por un término de 2 a 5 meses, no lograron infectar a los individuos que las recibieron. Hasta que se aproximó el tiempo en que normalmente puede ocurrir una recidiva, no aparecieron las primeras subinoculaciones positivas. Cuando una recidiva con su parasitemia y síntomas visibles cedía, las subinoculaciones continuaban siendo positivas durante varios días y luego se convertían en negativas, permaneciendo así durante unos días antes de la siguiente recidiva, si es que ésta ocurría. Con la administración diaria de atebрина, en la forma arriba indicada, no se encontraron parasitemias pasajeras como ocurre con el *falciparum*, pero aun continuando el tratamiento durante 3 semanas después de la picadura, los parásitos y síntomas aparecían generalmente en el paciente poco después de suspenderse la administración de la droga. El tratamiento curativo con atebрина, que había resultado tan eficaz en el *falciparum*, siempre controló el ataque primario y eliminó la parasitemia, pero no impidió que ocurriera una recidiva.

En los casos de pacientes infectados por inoculación de sangre, más que por la picadura de mosquitos, la situación era muy distinta. Esos individuos recibieron sólo las formas eritrocíticas asexuales. Mientras éstas persistieron en la sangre, las subinoculaciones resultaron positivas, aun cuando el número de parásitos en el inóculo fuera submicroscópico. Los enfermos, ya fueran infectados por *falciparum* o por *vivax*, se curaron rápidamente con cantidades más pequeñas de drogas; una vez que llegaban a ser negativos a la subinoculación continuaban así. Esos experimentos demostraron, sin lugar a dudas, que existía una fase pre-eritrocítica en la infección por *falciparum*, de 6 días de duración, al cabo de los cuales desaparecía, y que, una vez eliminada la infección asexual, el paciente quedaba completamente curado.

En los casos de infección por *vivax* inducida por esporozoitos, la fase pre-eritrocítica duraba 8 días completos. Pero evidentemente no desaparecía por completo porque, después de un período en que no se observaban en la sangre formas en circulación, ocurrían con frecuencia, aunque no constantemente, una o más repeticiones de parasitemia y actividad clínica. Esto no ocurrió jamás cuando las infecciones se provocaron con inyecciones de sangre. Las deducciones derivadas de esos experimentos indicaron la existencia de una fase *oculta de desarrollo* que producía, en el *falciparum*, merozoitos que infectaban solamente a los glóbulos rojos. Tratándose del *vivax*, se suponía que esta fase oculta producía merozoitos infectivos no sólo para los glóbulos rojos, sino también para ciertas células capaces de mantenerlos en un sitio todavía desconocido.

La pronunciada diferencia en el comportamiento exoeritrocítico entre el *falciparum* y el *vivax* justifica la creación de una nueva especie: *Laverania*. Por lo tanto, el *P. falciparum* podría llamarse con el tiempo *L. falcipara*.

De los experimentos antes descritos se deducen las siguientes conclusiones:

1. La malaria por *falciparum* es perfectamente curable, mediante una sola dosis de medicamentos apropiados.
2. No todas las infecciones por *vivax* producen recidivas; la proporción de las que no las producen llega a un 30 por ciento.
3. La medicación que erradicará la infección por *falciparum* no eliminará la recidiva por *vivax* que, en caso de ocurrir, rara vez continúa así por más de tres años.

4. Es posible que la medicación supresiva prolongada erradique también el *falciparum*, pero el *vivax* puede reaparecer clínicamente cuando se suspende la medicación.

Al parecer, la idea de explorar el hígado para descubrir esas fases ocultas fue sugerida por una observación hecha por el Profesor Garnham en Africa Occidental, donde había observado pequeñas vesículas en la superficie del hígado de monos en cuya sangre se encontraron gametocitos de *Hepaticystis kochi*. Esos quistes, que más tarde se demostró que contenían numerosos merozoitos, nunca se observaron en animales no infectados.

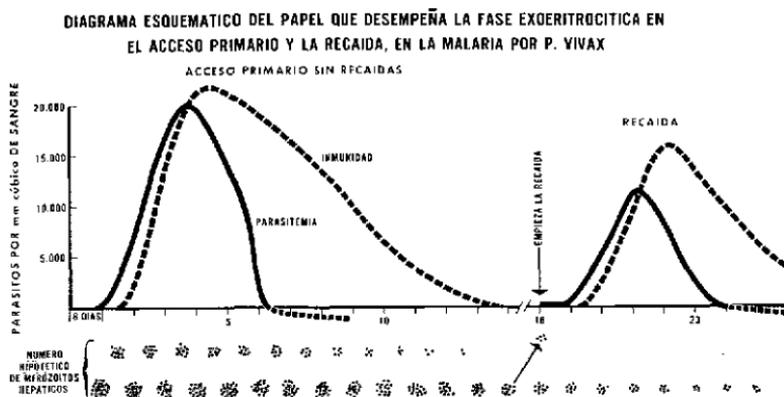
Las fases hepáticas fueron demostradas por primera vez por Shortt y Garnham en un mono infectado de *P. cynomolgi*, y poco después en un caso humano de infección provocada de *P. vivax*. La fase hepática del *P. falciparum* en el hombre se demostró en Inglaterra, y algún tiempo después en los Estados Unidos de América. En 1953, se demostró que el *P. ovale* tiene una fase hepática de 9 días de duración. En 1959 Bray comprobó que la fase hepática del *P. malariae* puede durar 11 días. En las cuatro especies, las fases hepáticas tienen una apariencia similar. Las formas más jóvenes se encuentran en los citoplasmas de una célula del hígado; la cromatina se divide por fisión binaria. En la madurez, el *vivax*, el *malariae* y el *ovale* contienen centenares de merozoitos, mientras que el quiste del *falciparum* puede contener varios millares. El único daño para el hígado parece ser una compresión de algunas células adyacentes, pues no se ha observado ninguna infiltración celular reaccionaria. Al romperse el quiste, los merozoitos descubiertos se incrustan en las células adyacentes del hígado hasta encontrar un sinusoides que contenga glóbulos rojos. A partir de entonces comienza la fase eritrocítica.

Otro plasmodio de los monos, el *P. knowlesi*, que tiene un ciclo eritrocítico de 24 horas y una fase pre-eritrocítica que dura 5 días y medio, ha sido usado repetidamente para infectar artificialmente al hombre.

Entre 1960-1963 se estudiaron más de 100 casos satisfactorios de infección en el hombre debida al *P. cynomolgi* y otras especies simias de malaria.

El diagrama esquemático (Diagrama 1), completamente imaginario, constituye una tentativa de explicar el papel de la fase exo-eritrocítica de la malaria debida al *vivax* en:

1. Un ataque primario sin recaída.
2. Una recaída después de un ataque primario.



La línea compacta indica la parasitemia medida por la escala de la izquierda. El nivel de parásitos es submicroscópico allí donde la línea se convierte en intermitente. La línea de puntos sugiere el grado de inmunidad; la escala inferior marca la duración de un ciclo exoeritrocítico completo, o bien 8 días.

Debajo del diagrama, la fila superior de racimos de puntos cada vez más pequeños indica el número de merozoitos hepáticos que llegan a la circulación después de esquizogonias hepáticas sucesivas. Este número decrece con cada ciclo hepático, hasta que cesa la formación de esquizontos hepáticos.

La fila inferior de racimos de puntos representa un número mayor de merozoitos hepáticos liberados cada 8 días. Sólo se requiere una fracción de ellos para iniciar la parasitemia de una recaída (al final del 18º ciclo hepático), a condición de que la inmunidad sea tan baja que la progenie de la primera esquizogonia eritrocítica eluda la destrucción e invada con éxito nuevas células rojas. Tal vez se deba suponer que los merozoitos que proceden directamente del hígado no sean afectados por la inmunidad del huésped; sin embargo, los producidos por la primera y subsiguiente esquizogonia eritrocítica son, sin duda, susceptibles a la inmunidad que ya se ha desarrollado.

Es muy posible que las recaídas deriven de esquizontos hepáticos latentes o que crecen muy lentamente. El desarrollo latente explicaría también los ataques primarios retardados del llamado *vivax* de clima templado.

3. LA SANGRE EN RELACION CON EL DIAGNOSTICO DE LA MALARIA

La sangre es el medio en que se hallan los parásitos de la malaria. Puesto que la sangre es el vehículo que trae el parásito al campo microscópico visual de la persona que lo busca, es importante saber algo acerca de ella.

La sangre está constituida por un líquido llamado plasma, en el cual se encuentran en suspensión elementos celulares (eritrocitos, leucocitos, plaquetas sanguíneas) que se desarrollan en la médula ósea y pasan a la circulación periférica según los requerimientos del organismo.

Los eritrocitos, o glóbulos rojos, son discos bicóncavos¹ que aparecen aislados o en grupos como pilas de monedas. Cuando se presiona suavemente la sangre fresca bajo el portaobjetos, los eritrocitos son comprimidos y sufren gran distorsión sin perjuicio de su estructura. Son de color amarillento o amarillo oscuro, por su contenido abundante de hemoglobina, en la cual los parásitos, si están presentes, sólo pueden ser reconocidos si son suficientemente grandes como para contener pigmento. Por lo tanto, el examen de sangre fresca no es práctico. Los glóbulos rojos tienen una duración máxima de vida de 120 días.

Los eritrocitos también se derivan de un tipo de células de la médula ósea y los estados primarios contienen núcleo. Justamente antes de que estos eritrocitos en desarrollo sean liberados a la circulación, el núcleo se pierde y los glóbulos rojos jóvenes, de distintos tamaños, pueden contener elementos fáciles de teñir de azul (los cuales se ven solamente con coloraciones especiales del extendido) que se describen como "reticulum" (de reticulocitos), policromasia y basofilia punctata, todos los cuales desaparecen en un período de 1 a 3 días después de ser liberadas las células a la circulación. En los exámenes de gota gruesa² es posible ver, en los espacios claros entre los leucocitos, no sólo plaquetas sino también masas azulejas cuyo tamaño varía desde el de un linfocito pequeño hasta uno grande polimorfonuclear y extendido. Estas masas azulejas son los restos de eritrocitos jóvenes (reticulocitos). Varían en apariencia desde una bruma fina y una nebulosidad moteada, hasta

¹ Véase el diagrama que figura en el Apéndice 3, pág. 100.

² Véase la Sección 6, págs. 35-37.

LEUCOCITOS



LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES



EOSINOFILO



LINFOCITO PEQUEÑO



MONOCITO



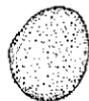
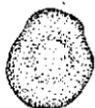
LINFOCITO GRANDE



PLAQUETAS



RESTOS CELULARES



ERITROCITOS

un conjunto de puntos azules densos de distinto tamaño. Su número también varía desde 1-3 por campo microscópico en la sangre normal, hasta una cantidad innumerable donde la malaria u otra infección ha producido una anemia grave que ha obligado a la médula ósea a despedir una gran cantidad de células antes de completarse la maduración de los glóbulos rojos.

Bajo condiciones variables a su alrededor, la apariencia de los glóbulos rojos frescos puede alterarse enormemente. En suero o en solución de 0,85% de cloruro de sodio, conservan sus bordes periféricos lisos y circulares. Si la cantidad de sal se aumenta a 1,5%, la célula muestra pequeñas protuberancias en su superficie exterior, semejando las de una mina submarina de contacto. Estas células "crenadas" pueden conservar este aspecto aun después de coloreadas. El exceso o la insuficiencia de sal en la solución causa la ruptura de los glóbulos rojos liberando su hemoglobina, y el agua de la solución se torna y permanece rojiza.

La exposición a fuertes alcoholes, la aplicación de calor, o simplemente el transcurso del tiempo, "fijarán" la hemoglobina de las células y no se producirá deshemoglobinización. De ahí la necesidad de colorear las gotas gruesas tan pronto como sea posible una vez que han sido extraídas.

Los leucocitos, o glóbulos blancos, son transparentes, muy "refringentes" y pueden mostrar movimiento de su citoplasma. En general, su núcleo debe ser de un color violeta azulado. El núcleo varía en tamaño y forma, y el citoplasma puede ser claro o granulado, de acuerdo con el tipo de célula. La vida de un leucocito es breve, de 3 a 5 días solamente, de modo que la apariencia de algunos de los tipos polimorfonucleares varía desde elementos sólidos, perfectamente definidos y bien teñidos, hasta células grandes, pálidas e irregulares y, a menudo, desfiguradas. En el Diagrama 2 se presentan algunos ejemplos de los leucocitos más comunes.

Las plaquetas sanguíneas (Diagrama 2) no tienen núcleo, ya que se originan en el citoplasma de una enorme célula de la médula ósea llamada *megacariocito*. Deben identificarse aisladamente o en grupos. Su densidad puede ser diferente en un mismo portaobjetos, y el color puede variar del rosa al violeta (jamás azul) en diversos especímenes. Varían en tamaño y forma; en sangre que se haya secado lentamente o que haya sido desfibrinada, pueden ase-

mejarse a cualquier cosa. Si los portaobjetos han permanecido durante mucho tiempo sin colorear, es posible que la coloración de las plaquetas se vuelva tan intensa que oculte a los parásitos pequeños.

Cómo encontrar los parásitos de la malaria en la sangre.

El hecho de que los parásitos de la malaria no se revelen a veces en los exámenes microscópicos, no quiere decir que no estén presentes en el momento en que se toma la muestra de sangre, sino que posiblemente su número es demasiado pequeño para ser determinado en exámenes ordinarios. Por ejemplo, en Ghana, en una clínica prenatal, algunas mujeres fueron cuidadosamente vigiladas mediante exámenes regulares de gota gruesa de 100 campos microscópicos en cada paso. Se encontraron gametocitos de *P. falciparum* en un 7 por ciento. Cuando se prepararon 10 gotas gruesas simultáneamente y se hicieron exámenes de 100 campos en cada una de ellas, el 20% mostraron gametocitos. Como dato interesante, observamos que 6 exámenes fueron suficientes para encontrar un 18% de casos positivos, y 4 exámenes posteriores solamente produjeron 2% más de casos.

El único modo de demostrar que una persona no tiene parásitos de la malaria en la sangre consiste en inocular 2-400 cc de sangre a un voluntario. Si no hay parasitemia, se puede afirmar que la sangre es negativa; si la hay, quiere decir que la infección original era submicroscópica cuando se extrajo la muestra de sangre.

Hay que tener en cuenta también que la sangre de un individuo normal, sano y bien nutrido, puede ser completamente diferente de la de una persona que ha padecido de malaria o de alguna otra enfermedad debilitante, durante un tiempo considerable. Se pueden producir cambios en el aspecto normal de los parásitos por alteraciones en la forma de los glóbulos rojos, muy independientemente de la especie de infección malárica de que se trate.

A pesar de la manera en que aparecen los parásitos en la gota gruesa deshemoglobinizada, los parásitos de la malaria no pueden tener una existencia independiente. Excepto en los períodos breves en que se mueven de una célula a otra, son *intracelulares* en los glóbulos rojos.

Cuando la sangre integral se deja en reposo en un tubo de ensayo, se coagula debido a la interacción de las plaquetas y elementos del plasma que producen fibrina. Cuando la masa esponjosa de fibrina, que contiene la mayor parte de glóbulos rojos, se con-

trae y forma un coágulo, el *suero* amarillo claro se separa al dejarse el contenido del tubo en reposo. A menos que sea extendida rápidamente, una gota de sangre en un portaobjetos se coagulará exactamente del mismo modo que en el tubo de ensayo, con un cambio considerable en el plasma; esto afecta el modo en que la preparación se adhiere al portaobjetos. Si se extiende la sangre en frotis después que comienza la coagulación, se producirán áreas de diferentes espesores, y distintas concentraciones de células, que pueden reconocerse fácilmente al ser examinadas con el objetivo de baja potencia del microscopio. Se verán hileras o aglomeraciones de leucocitos, en vez de la distribución regular y uniforme de los mismos en la preparación esparcida rápidamente.

La parte líquida de la sangre contiene tantos anticuerpos como produce el organismo y proporciona un medio líquido de mantener húmedos los parásitos y las células. La falta de humedad destruye a ambos. La porción celular proporciona una variedad de elementos en las preparaciones de la sangre, que no solamente ofrecen información acerca del paciente sino que ayudan a evaluar la calidad de la preparación y su coloración.

Una gota de *sangre fresca* colocada en un portaobjetos, cubierta con un cubreobjetos e iluminada con luz muy reducida por la cerradura del diafragma del microscopio, puede ser examinada con objetivos de baja potencia (10x) y de alta potencia (43x). También se puede usar el objetivo de inmersión¹ si la acción de enfocar no mueve las células.

Aspecto de los elementos de la sangre en una gota gruesa bien coloreada

Leucocitos. En general, los núcleos multiformes de los leucocitos deben tener un color azul-violeta intenso, en tanto que el citoplasma varía según el tipo de célula. Los *neutrófilos* tienen gránulos de distintos colores que son irregulares en tamaño, forma y distribución. El colorante de calidad inferior puede dar al citoplasma un color rojo tan intenso que un microscopista sin experiencia posiblemente cometa el error de clasificar estas células como eosinófilos. En contraste, los gránulos del citoplasma de los eosinófilos son tan grandes y regulares en tamaño, forma y densidad que pueden reconocerse fácilmente cuando no están teñidos, etapa

¹ Véase el Apéndice 17, pág. 117.

en que los núcleos no pueden distinguirse. Los gránulos compactos son de color cobre-rojizo intenso; son casi imperceptibles y no tienen el color del rojo vivo al rosa que es la característica de los cortes tisulares teñidos con eosina. Si hubiera que seleccionar un solo aspecto que sugiriera la calidad inferior del colorante, podría muy bien elegirse la apariencia de estos gránulos.

Los linfocitos y monocitos (véase el Diagrama 2, pág. 12) tienen solamente una masa única de materia nuclear. Los linfocitos *pequeños* revisten suma importancia para el microscopista porque sirven de unidad para medir el tamaño en la gota gruesa de sangre, en la misma forma en que se utiliza el glóbulo rojo en el frotis o extendido. El linfocito pequeño es la célula más uniforme de la sangre y mide de 8 a 10 micrones. Probablemente sobrevive en la corriente sanguínea unos 100 días. El citoplasma de los linfocitos es de color azul pálido, algo transparente, y a veces contiene unos pocos gránulos de color rojo intenso.

Los monocitos son, desde el punto de vista clínico, las células más importantes para el paciente y su número aumenta durante la infección malárica. Como fagocitos activos, son capaces no sólo de absorber el pigmento de la malaria, sino incluso los glóbulos rojos que contienen esquizontos maduros. Su citoplasma muestra una estroma fina azul-parda y los núcleos tienen una hendidura más o menos pronunciada (Diagrama 2).

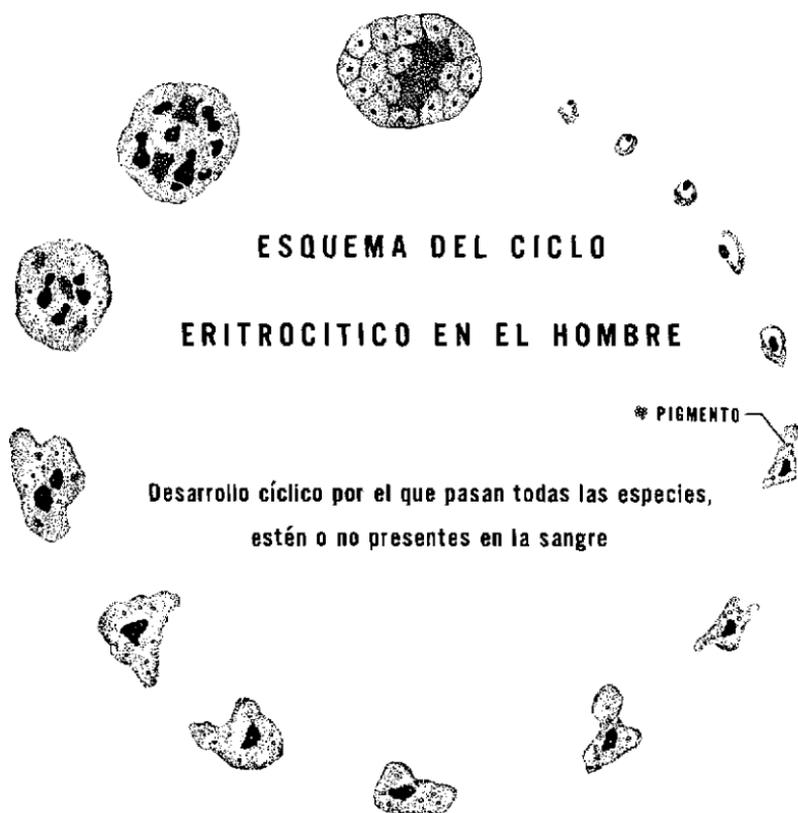
4. COMPORTAMIENTO GENERAL DE LAS DISTINTAS ESPECIES DE PLASMODIUM EN LA SANGRE PERIFERICA

Los parásitos varían en tamaño, forma y aspecto, exactamente igual que cualquier animal multicelular.

Algunas formas de una especie, es decir, las fases más desarrolladas de tipo gametocítico del *P. vivax*, pueden parecer idénticas a fases mayores del *P. malariae*. En realidad, sólo hay una forma de parásito que pueda considerarse única o típica, y es la del gametocito del *P. falciparum*.

Para obtener un diagnóstico exacto de las especies, es necesario que se encuentre presente suficiente número de diferentes ejempla-

DIAGRAMA 3



res del parásito para que revele el *tipo de variación* que es constante en cada especie. No basta con retener en la memoria una lista de los diversos aspectos que se han observado comúnmente en los frotis de diversas especies y a los que se han atribuido características especiales que no siempre son ciertas. Es necesario que el examinador sepa cuáles son las posibles variaciones de formas que se presenten, no sólo en cada una de las distintas especies, sino también en las diversas condiciones de la sangre.

Cada vez que el examinador observa una nueva forma de parásito se ha de preguntar: a) ¿Es esto un verdadero parásito? y, si lo es, b) ¿Encuadra su aspecto en el *tipo de variación* que cabe esperar en la presunta especie? (Diagrama 3).

La contestación a la primera pregunta se suele obtener buscando en las inmediaciones un parásito sobre el cual no haya duda de ninguna clase. Se evalúa el color y la densidad de la cromatina,

lo mismo que el aspecto del citoplasma. Si estas características no son similares en el nuevo elemento encontrado, es probable que no se trate de un organismo genuino.

Una vez que nos decidimos a considerarlo como un verdadero parásito, surge la primera pregunta: ¿Cuántos hay presentes? y, luego, la segunda ¿Está su fase de desarrollo comprendida dentro de las modalidades que, según nos enseñan la observación y la experiencia, se pueden presentar en determinado momento en el ciclo de la especie "X", o es ésta una etapa que nunca está presente en el ciclo de la especie "X"?

Por ser la revisión de portaobjetos indispensable para el diagnóstico de la especie, es cada vez más importante determinar, una vez que los parásitos han sido reconocidos, si abundan o escasean. Si existen en gran cantidad, es probable que el diagnóstico de la especie esté correcto; si están presentes en muy pequeño número, es posible que la verificación sea difícil. Mediante un sistema de símbolos se puede efectuar un cálculo aproximado del número de parásitos presentes.¹

Para determinar esta variación se necesita un mínimo de 50 campos microscópicos de una gota de sangre positiva, antes de formular un diagnóstico definitivo. Si es evidente que no todas las formas pertenecen a la especie "X", se necesitarán otros exámenes para confirmar la sospecha de que se han encontrado también algunas muestras de una segunda especie.

Generaciones. Como lo demuestra esquemáticamente la película de Shortt, mencionada en la pág. 3, todas las especies pueden producir más de una generación de parásitos al mismo tiempo. Aunque los *falci-parum*, *vivax* y *ovale* requieren 48 horas para la madurez de las formas asexuales, es también posible, y no es raro, que cada uno produzca un paroxismo diario. Este paroxismo diario indica la existencia de dos generaciones de una de las especies precedentes, o puede reflejar la presencia de tres generaciones de *malariae*. Una vez determinada la predominante, todas las demás quedan suprimidas.

Se originan distintas generaciones cuando ocurre la liberación de merozoitos del hígado en diferentes momentos del ataque primario de una infección provocada por mosquitos. También puede ocurrir que aparezcan espontáneamente en una infección continua que haya mostrado, durante algún tiempo, una sola generación de periodici-

¹ Véase la Sección 14, Registro y notificación de los resultados, págs. 68-70.

dad regular. Para que se desarrolle una segunda generación *no* es necesario que la infección sea de origen esporozoítico. Parece que la esquizogonia de una infección de una sola generación (final de cada período de 48 horas) requiere que la mayoría de las células parasitadas se rompan dentro de la misma hora, mientras que las restantes completan su división a intervalos diversos, antes o después que la mayoría. Si esto ocurre durante un período de 5 horas, en vez de una hora, y la mayoría de las células se rompen durante la tercera hora, algunas no se dividen hasta 2 horas más tarde. Las que iniciaron el proceso esquizogónico, lo hicieron 2 horas antes que la mayoría.

Un ciclo más tarde, el grupo que empezó la esquizogonia, lo hizo 4 horas antes que la mayoría (los últimos grupos, 4 horas más tarde). Después de algunos ciclos, habrá un número considerable de parásitos madurados 24 horas antes y 24 horas después que la mayoría. Todos estos juntos pueden constituir un número suficiente para producir una esquizogonia adicional 24 horas antes de la que produce la mayoría, es decir, la generación predominante. De esta manera se crea otra generación, independientemente de la fase exoeritrocítica.

El Diagrama 4 (pág. 20) presenta esquemáticamente el ciclo eritrocítico, según se observa en la sangre periférica de las tres especies de parásitos de la malaria comunes en el hombre. Muestra las tres fases de la esquizogonia. En la parte superior, aparecen merozoitos después de la ruptura del esquizonto maduro. Estos merozoitos entran rápidamente en los hematíes (*vivax* a la derecha). Aunque desde la parte superior a la inferior del diagrama, el ciclo es continuo y la forma más pequeña (parte superior del diagrama) se encuentra inmediatamente después de la ruptura de los esquizontos más grandes. La identificación de las especies se facilitará considerablemente si se transfiere mentalmente un organismo recién encontrado al lugar que le corresponda en este ciclo diagramático.

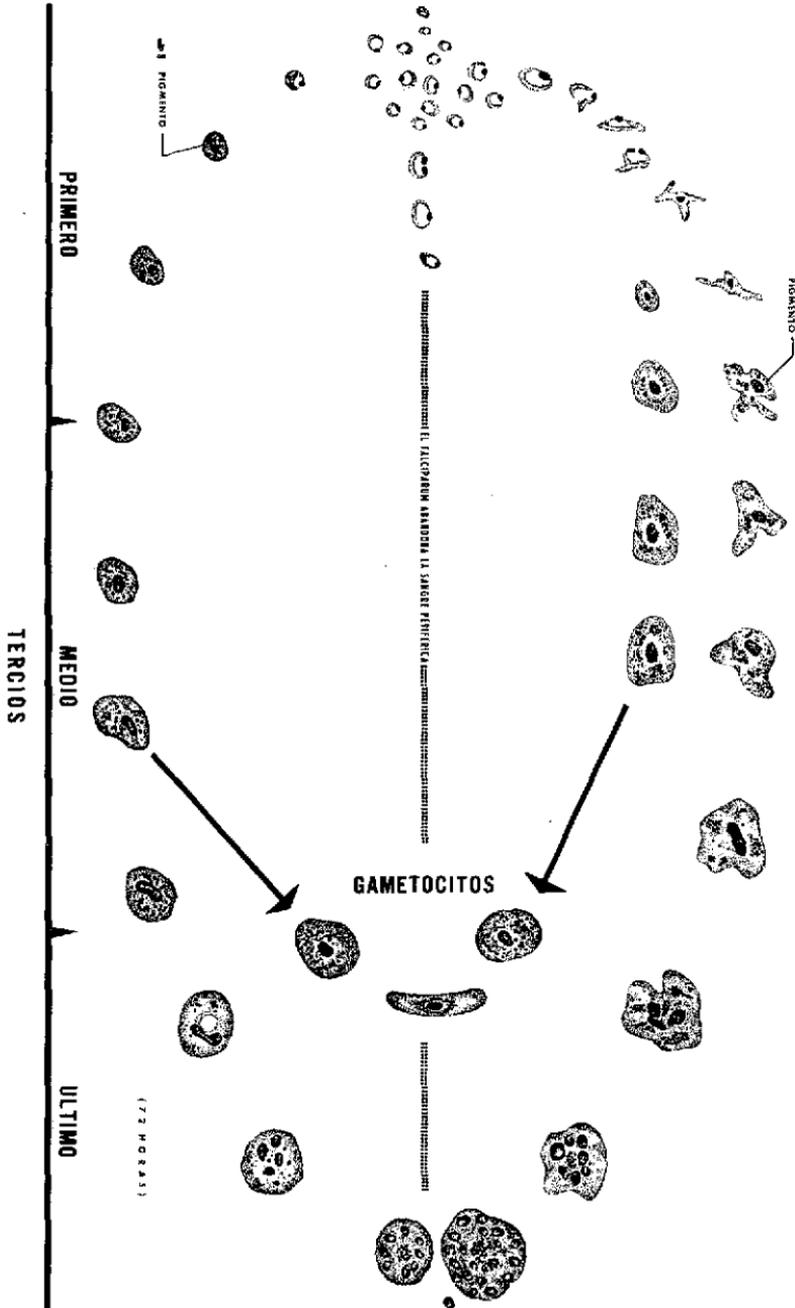
5. CARACTERISTICAS INDIVIDUALES DE LAS ESPECIES EN LA SANGRE PERIFERICA

Se observan varias diferencias en el comportamiento de las distintas especies, no sólo en los síntomas que experimenta el paciente, sino también en las formas presentes en la sangre.

DIAGRAMA 4

MEROZOITOS HEPATICOS O ESQUIZONTOS ERITROCITICOS
ENTRAN RAPIDAMENTE EN LOS HEMATIES

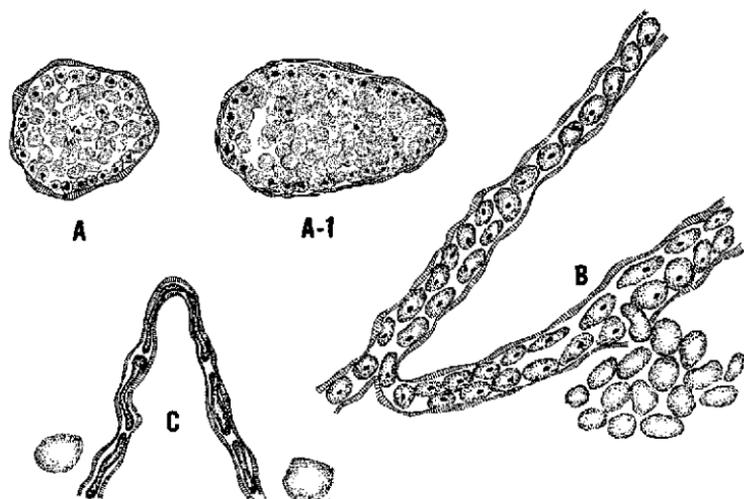
EL CICLO ERITROCITICO EN EL HOMBRE



P. falciparum. Parece ser que cuando el merozoito del *falciparum* penetra en un glóbulo rojo, su simple presencia produce alteraciones en los propios glóbulos rojos, que podrían describirse como una pegajosidad de su capa o membrana externa. No se debe, indudablemente, a ninguna propiedad específica de la célula, puesto que los merozoitos de *falciparum* penetran indistintamente en los glóbulos rojos jóvenes y viejos, en contraposición a los merozoitos del *vivax* que muestran preferencia por las células jóvenes, de la misma manera que el *malariae* se inclina decididamente por las células viejas.

El Diagrama 5 presenta esquemáticamente los hallazgos de la autopsia de una infección mortal de *falciparum*. Tal vez convendría explicar, en primer término, que no cabe esperar en las secciones de tejidos el conocido aspecto que presentan los parásitos en las células parasitadas de una muestra de sangre bien coloreada. Con la acostumbrada coloración de hematoxilina y eosina, raramente se ven los parásitos, pero su presencia está indicada por una cantidad de pigmento que es proporcional al tamaño del parásito durante su vida.

DIAGRAMA 5



ASPECTO, EN LA AUTOPSIA, DE UNA INFECCION FATAL POR *P. falciparum*

La cromatina y el citoplasma pueden distinguirse en el material que ha sido coloreado sin demora en el fijador apropiado y teñido con colorante de Tomlinson.¹

Un examen de cualquier tejido, especialmente del cerebro, demostrará la frecuencia con que los glóbulos rojos parasitados se encuentran a lo largo de las paredes de los pequeños vasos sanguíneos donde tanto la corriente sanguínea como la presión son bajas. En los vasos menores, en los que se produce muy poco o ningún movimiento, no se desalojan estos glóbulos rojos parasitados y ligeramente adheridos. Por consiguiente, una pequeña vénula puede mostrar su borde totalmente cubierto de glóbulos rojos parasitados, mientras que en el lumen del vaso, lleno de glóbulos rojos, éstos rara vez revelan la presencia de parásitos (sección A del Diagrama 5). Aunque la sección A se dibujó por primera vez en 1946 para facilitar la explicación del fenómeno de la pegajosidad, 8 secciones seriadas del cerebro de un caso fatal de malaria por *falciparum* que ocurrió en Costa Rica en 1959, mostraron que la sección transversal de una pequeña vénula era casi idéntica a la sección A, según puede verse en la reproducción de la fotomicrografía A-1.

De una manera más definida, en los capilares se observa casi siempre que cada uno de los glóbulos rojos tiene una mancha de pigmento que es todo lo que queda de lo que fue un parásito. El fenómeno que se ha producido puede comprenderse si se encuentran hemorragias petequiales de un capilar roto. Ninguno de los glóbulos rojos que forman la hemorragia contendrá parásitos, puesto que en estos espacios limitados, las células parasitadas se adhieren al revestimiento endotelial (sección B). Con su conocida facilidad para acomodarse a una diversidad de constricciones y obstrucciones, mientras exista alguna presión, las células *no parasitadas* pueden meterse (sección C) en torno a las células fijas y salir por la apertura que se produce a consecuencia del grave daño sufrido por algunas de las células de revestimiento. Mientras el endotelio permanece intacto no se presentan hemorragias.

La muerte no ocurre como resultado de la presencia de alguna sustancia tóxica emanada por los parásitos, sino más bien por la interferencia en la función normal del endotelio vascular. Es evidente que la muerte se produce cuando el número de células parasitadas es tan elevado que los tejidos, cuya existencia depende de este suministro vascular, quedan desprovistos de oxígeno, electrólitos,

¹ Boyd, Mark F., ed.: *Malariology*. Filadelfia y Londres: W. B. Saunders Company, 1949, págs. 899-900.

etc., especialmente si esta situación ocurre con respecto a centros vitales. No es probable que la muerte se produzca en el momento de la esquizogonia, sino más bien inmediatamente después de que un número máximo de células recién parasitadas se retiren de la sangre circulante y se sitúen sobre la superficie del endotelio vascular. Es probable que el notable mejoramiento que se observa, con frecuencia, en infecciones cerebrales graves, coincida con una esquizogonia que temporalmente libera el endotelio de las células que lo obstruyen. Al aumentar el número de células infectadas como consecuencia de esta esquizogonia queda ocupada una parte del endotelio, superior a la que se puede resistir. Como resultado, sobreviene la muerte, probablemente de 15 a 24 horas después de la esquizogonia final.

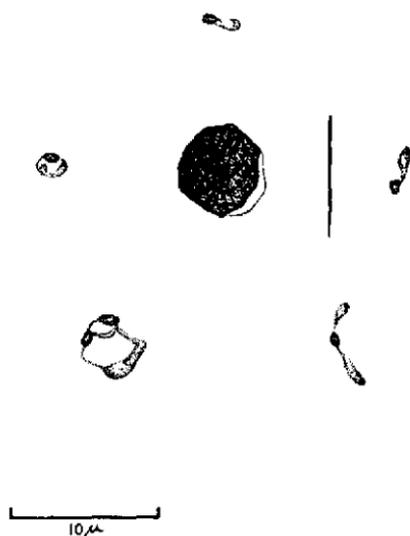
En patología es muy probable que la diferencia entre un caso mortal de *falciparum* y un caso grave que se restablece sea sólo de grado. Aunque resulta cada vez más difícil encontrar infecciones graves de *falciparum*, con elevada parasitemia, se cree que si éstas ocurren en centros que cuenten con servicios adecuados, se pueden intentar biopsias hepáticas por aguja, con el fin de demostrar el cuadro patológico.

De lo que antecede, se comprenderá fácilmente por qué en la sangre periférica se encuentran solamente las formas jóvenes del parásito en desarrollo. Sólo cuando se produce choque pueden observarse los fenómenos embólicos. Evidentemente, la falta de tono muscular de las paredes vasculares permite a las células ligeramente adheridas cambiar de lugar.

Se supone que el crecimiento y desarrollo de los gametocitos del *falciparum* tienen lugar en los glóbulos rojos y que lo mismo ocurre con aquellos adheridos al revestimiento del endotelio; pero con la madurez de los gametocitos y su elongación, el glóbulo que los contiene se libera en la circulación.

Es posible que ocurra la alta parasitemia característica porque esos vasos sanguíneos, cuyo revestimiento está ocupado por células parasitadas, están también llenos de células no infectadas. Los esquizontos que se rompen en su posición fija liberan merozoitos que quedan materialmente comprimidos contra centenares de células. Cualquiera que sea la edad de la célula, uno o más merozoitos penetrarán rápidamente en los glóbulos rojos de la sangre que se encuentran más próximos.

En un ataque primario de malaria por *falciparum*, la parasitemia puede observarse a los 10 ó 12 días, y va seguida, en el término de

P. falciparum

24 horas, de la aparición de síntomas. Si el organismo está en condiciones de producir gametocitos, no comenzarán a aparecer hasta 8 ó 10 días después. Si se dejan sin tratar, las formas anulares y los gametocitos pueden persistir juntos durante varios días o semanas, hasta que haya inmunidad suficiente para eliminar las formas asexuales. No se producen más gametocitos cuando desaparecen las formas asexuales, pero los que ya se encuentran presentes pueden continuar circulando de 2 a 4 semanas. (Véase el Apéndice 2. El comportamiento de los gametocitos del *P. falciparum*, pág. 99).

Los símbolos F para formas anulares solamente, F+g para formas anulares con gametocitos y Fg para gametocitos solamente,¹ describen exactamente los hallazgos de las muestras de sangre en las tres fases de la infección por *falciparum*.

El estudiante que empieza a aprender el diagnóstico de las especies debe tener acceso por lo menos a una docena de muestras de sangre distintas que contengan F y F+g. Cada parásito debe ser estudiado detenidamente hasta que el estudiante haya observado el

¹ Véase la Sección 14, Registro y notificación de los resultados, págs. 68-70.

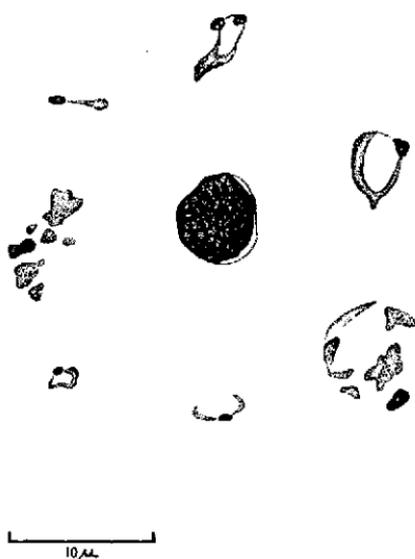
mayor número posible de anillos del *falciparum*. Debe reconocer el grado de variación que ha de encontrar y procurar aprender el tamaño máximo que puede alcanzar el parásito *falciparum* en desarrollo que se observa en la sangre periférica.

Si procede en esta forma, el estudiante sabrá que cuando se encuentra ante formas más grandes que la máxima, en cualquier momento que sea, es más probable que la infección sea causada por el *vivax* o el *malariae*. El estudiante sabrá también cuáles son los anillos más pequeños que pueden observarse. Los anillos de *falciparum* se dividen en pequeños, medianos y grandes. Cuanto más cerca esté de la última esquizogonia el momento en que se tome la muestra de sangre, mayor será la proporción de anillos pequeños. Si la proporción de anillos grandes es mayor, hay que suponer que el número total de parásitos disminuirá notablemente dentro de 6 horas. Conviene aclarar también que, cuando se trata de una infección de una sola generación, los parásitos pueden estar totalmente ausentes de la sangre durante varias horas, tal como se indica en el Diagrama 4 (véase pág. 20). Por otro lado, las infecciones de una sola generación son raras en las poblaciones semi-inmunes.

Es posible, naturalmente, que haya todavía más de una generación de *falciparum* al mismo tiempo, haciendo que los parásitos nunca desaparezcan de la sangre periférica, aunque su número pueda variar considerablemente.

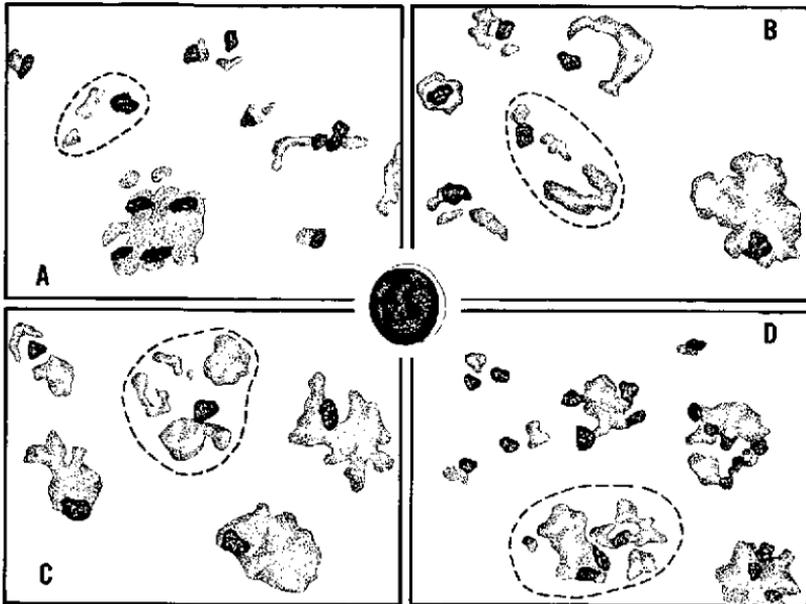
P. vivax. La palabra *vivax* significa vivaz y expresa exactamente la actividad casi frenética que con frecuencia muestra esta especie. El merozoito de *vivax* tiene una clara preferencia por los glóbulos rojos jóvenes, que son más elásticos que los maduros; en consecuencia, pueden dilatarse para acomodar mejor al parásito en desarrollo. Sin embargo, en vista de que no se observa ninguna viscosidad de los glóbulos rojos que los contienen, como ocurre con los *falciparum*, los glóbulos rojos parasitados circulan todo el tiempo durante el ciclo o series de ciclos eritrocíticos mientras la esquizogonia se produce en la circulación. El período en que los merozoitos liberados buscan una nueva célula huésped es mucho más largo que el que se observa cuando se trata de *falciparum*, y de este modo, el número de parásitos fagocitados es mucho mayor y la duración de este período no excede, probablemente, de 5 minutos. Las parasitemias totales nunca son tan elevadas como en el caso de *falciparum*. Los merozoitos del *vivax*, en su apremio por encontrar nuevo alber-

DIAGRAMA 7

P. vivax

gue, a veces invaden una nueva célula en la que penetran uno, dos o más de ellos. Al fraccionarse cada uno, no es raro encontrar más de una mancha de cromatina en los nuevos parásitos; la segunda mancha de cromatina es, con frecuencia, menor que la primera. Aunque estos parásitos relativamente jóvenes parecen ya experimentar segmentación, no es éste el caso. El parásito del *vivax* se mueve por todo el glóbulo rojo en el que recién se ha introducido, produciendo pseudópodos citoplásmicos que llegan a todas las partes de la célula. Esto da lugar a la aparición de formas extrañas, tan numerosas y variables que es imposible tratar de describir más de un reducido número de ellas. En consecuencia, es posible que no se pueda reconocer en su totalidad un parásito grande, irregular en una gota gruesa de sangre. Los pequeños bastoncillos de citoplasma que unen varias partes son demasiado finos para ser percibidos (Diagrama 8). Ocurre con frecuencia que una parte del parásito es compacta y puede contener todo el pigmento del resto del citoplasma, lo que da por resultado que cantidades más pequeñas de citoplasma que se encuentran próximas no se tomen en cuenta. De

DIAGRAMA 8



ASPECTO DEL PARASITO *P. vivax* EN LA GOTA GRUESA, A INTERVALOS DE 12 HORAS

hecho, para identificar lo que constituye todo el parásito en una gota gruesa, se requiere muchas veces examinar todo lo que se ve dentro de un área que tenga el tamaño del leucocito polimorfonuclear más grande que se observa en la misma sangre. La confusión que frecuentemente se produce en el diagnóstico del *vivax* y del *malariae* se debe al hecho de que estas grandes y densas partes se consideran como parásitos enteros.

En lugar de hacerse pegajosa, la membrana de los glóbulos rojos experimenta ciertas alteraciones que, al colorearse con el frotis, producen una serie de gránulos rojizos, de tamaño, forma y distribución regulares, en la envoltura de la célula. Estos gránulos, que al principio son finos, pero luego se hacen mayores y más prominentes, se conocen con el nombre de puntos de Schüffner.¹ En la gota gruesa, especialmente en la periferia, este fenómeno de coloración aparece como un halo rosado alrededor de los parásitos, y ocupa todo el glóbulo rojo que los contiene. Esta coloración de Schüffner sólo se produce en el caso de infecciones de *vivax* y de *ovale*. Hay que aprovechar únicamente la oportunidad de su presencia, *no de*

¹ Véase el Apéndice 6, El fenómeno de la coloración de Schüffner, pág. 104.

su ausencia, puesto que para demostrar este fenómeno se requiere una coloración de cierta calidad. Sólo un 10% de los colorantes corrientes muestran estas alteraciones.

A medida que el parásito de *vivax* madura se vuelve redondo y regular, y cuando alcanza el pleno desarrollo, el pre-esquizonto adulto se parece tanto al gametocito que no es fácil distinguir uno de otro. Una vez establecida la parasitemia, los gametocitos aparecen muy pronto. Contrariamente al *falciparum*, los gametocitos de *vivax* no aparecen en la circulación totalmente desarrollados, sino que crecen en la sangre periférica. Los gametocitos en desarrollo, con citoplasma compacto y denso y frecuentemente con considerable pigmento, se confunden a veces con los parásitos del *malariae* en desarrollo en la primera parte del ciclo.

Además, a diferencia del *falciparum*, estos gametocitos no continúan circulando por mucho tiempo después de que se ha ingerido una droga esquizontocida. Son tan susceptibles a esta droga como los esquizontos. Jamás se deben confundir los gametocitos del *vivax* con los del *malariae* debido a la escasez de éstos últimos.

La proporción del ciclo total que se encuentra en una sola gota de sangre oscila entre $2/3$ ó $1/4$ del ciclo, según los casos. El número de merozoitos en los esquizontos maduros justamente antes de la segmentación, usualmente varía entre 14 y 24. Cuando existen dos generaciones, es posible encontrar todas las fases del parásito.

Puesto que comúnmente en una sola gota de sangre se encuentran todas las fases del parásito, es innecesario describir como trofozoitos, esquizontos y gametocitos las formas del parásito que se encuentran en cada espécimen.

Una simple V ($V = vivax$) implica que se hallan presentes todas esas formas. Aunque a veces se alega que sólo se pueden encontrar formas anulares de *vivax*, esto sucede muy rara vez y un examen minucioso revelará numerosas fases poco desarrolladas, irregulares, que no se encuentran jamás en el *falciparum* y con toda probabilidad, si se investiga cuidadosamente, se verán también formas segmentadas avanzadas.

Conviene subrayar que el *falciparum* domina al *vivax* y el *vivax* domina al *malariae*, pero es poco usual encontrar otra combinación que no sea el *vivax* acompañado de gametocitos de *falciparum*. Las denominadas infecciones mixtas no existen clínicamente, salvo por períodos de 24 a 48 horas, cuando luchan las dos especies presentes. En este caso también, el *falciparum* domina constantemente al *vivax* y el *vivax* regularmente domina al *malariae* (cuartana), esto es:

F>V>M. En el sentido clínico, por lo menos, casi nunca ocurre una infección mixta.

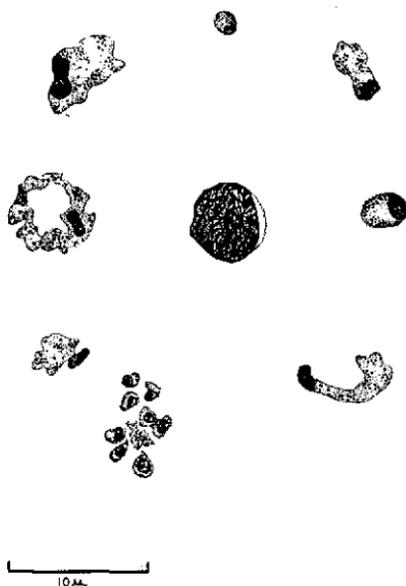
Una cierta indicación de los números proporcionales daría una idea más exacta. La infección agregada se puede indicar incluyendo un símbolo entre paréntesis, por ejemplo: +++F(17M),¹ lo que significa que hay más de 20 anillos de *falciparum* por campo y 17 parásitos de *malariae* por 100 campos.

P. malariae. La infección de cuartana que produce el *malariae* suele estar presente en las regiones donde se encuentran las otras dos especies, y se subordina por lo común a ellas, razón por la cual se la denomina especie de la estación de sequía. Debido a que los gametocitos son generalmente escasos, raras veces se produce en el laboratorio la transmisión por mosquitos. El período pre-eritrocítico dura 11 días y los parásitos pueden aparecer en la sangre en cualquier momento entre el 19° y el 30° día. Es bien conocida la persistencia de las infecciones por *malariae*. Se conoce un caso en el que ha estado activa durante 52 años. Como las modernas drogas esquizontocidas son muy eficaces, es poco probable que, en el futuro, se encuentren tantas infecciones de tan larga duración como en el pasado.

Las infecciones por *malariae* difieren de aquéllas causadas por las otras dos especies más importantes, produciendo efectos secundarios que aquéllas no causan; por ejemplo, afectan los riñones, y la pérdida de la hemoglobina excede de la producida únicamente por la rotura de las células parasitadas. En contraste con el *vivax*, el merozoito del *malariae* prefiere los glóbulos rojos más viejos. Esto, unido a su promedio de esquizogonia de 8 a 12 divisiones, resulta en una parasitemia total más baja que la del *vivax*. El aumento de 50% en el tiempo necesario para su completo desarrollo, y la actividad claramente más baja que muestra en comparación al *vivax*, dan lugar a una producción más temprana y mayor de pigmento. Una vez dentro de la célula, el parásito de la cuartana permanece inmóvil, alimentándose por ósmosis. No hay expulsión de pseudópodos. Las etapas avanzadas de pre-segmentación y segmentación a veces presentan considerable irregularidad por haber entrado el parásito en un glóbulo rojo, en forma de rosca.² Todo el parásito

¹ Véase la Sección 14, págs. 68-70.

² Véase el Apéndice 3, pág. 100.

P. malariae

está alojado en la parte tubular periférica de los discos bicóncavos de los glóbulos rojos que contiene una cantidad de hemoglobina inferior a la normal. Formas semejantes se encuentran en las infecciones por *vivax* que han persistido el tiempo suficiente para disminuir los valores hematológicos y de hemoglobina. Una sola gota de sangre muestra una parte menor del ciclo que la que se observa en el *vivax*. Tres generaciones existen cuando todas las fases del ciclo de *malariae* se encuentran en un espécimen de sangre (Diagrama 9).

Poco tiempo después que termina la fase anular hasta llegar a los esquizontos maduros, la característica general de los parásitos de *malariae* es la densidad, la pigmentación acentuada y la uniformidad y regularidad de forma. Se encuentra también un tipo de punteado, pero para conseguirlo se requiere un grado de excelencia técnica que rara vez alcanzan las preparaciones ordinarias.

No es raro encontrar que el 1-4% de parásitos característicos de cuartana persisten en una infección que, por otra parte, es claramente de *falciparum* o de *vivax*. Un error común que da lugar a diag-

nósticos erróneos de *malariae* se debe a los casos en que la sangre que contiene solamente gametocitos de *falciparum* se seca tan lentamente que el parásito tiene tiempo para redondearse. Si esas formas son bastante numerosas se llamarán, de manera errónea, parásitos de cuartana.

Sin embargo, las verdaderas infecciones mixtas no ocurren con suficiente frecuencia para justificar la asignación de una columna separada para ellas en los formularios de notificaciones. La presencia de esa columna implica una frecuencia que no existe; su importancia, en realidad, es muy poca y favorece el diagnóstico descuidado y la coloración de peor calidad. Se espera que las notificaciones y los registros sean un reflejo exacto de las infecciones de la población más bien que un informe recargado de hallazgos parasitológicos, cuyo valor es más académico que práctico.

P. ovale. Las verdaderas infecciones por *ovale* son sumamente raras y los microscopistas del Hemisferio Occidental que tengan que atender a otros trabajos, no deben dedicar demasiado tiempo al estudio de un caso sospechoso de *ovale*. Las infecciones prolongadas por *vivax*, cuando la sangre es suficientemente subnormal, pueden pasar por un período en el cual los glóbulos rojos sean deficientes en hemoglobina. Los cambios producidos en las células parasitadas presentan aspectos indistinguibles morfológicamente del verdadero *ovale*. Por lo tanto, es peligroso tratar de establecer un diagnóstico de *ovale* sobre una base morfológica solamente. Un diagnóstico de *ovale* puede considerarse correcto únicamente si el supuesto *ovale* se transfiere, ya sea mediante una aguja o un mosquito, a otra persona cuya sangre esté en buenas condiciones, y la nueva infección que resulta tiene las características propias de la infección producida por *ovale*. Si por casualidad, el espécimen sanguíneo se toma en un momento cercano al de la esquizogonia, los especímenes repetidos pueden demostrar un comportamiento distinto del *vivax*.

La infección de *P. ovale* se encuentra con más frecuencia en la costa occidental de África, pero también está presente en el África Oriental, en el Medio Oriente, Malaya, Indonesia y en las Filipinas. Es esencialmente una infección cuartana, aquella con un ciclo de 48 horas, y en la que los puntos de Schüffner están presentes en la parte no infectada del glóbulo rojo que contiene el parásito. En realidad, si el colorante no muestra la coloración rojiza de Schüffner alrededor de los parásitos en una gota gruesa, como se ve frecuente-

mente en infecciones de *vivax*, puede ocurrir que no se identifique la especie. Anteriormente se creía que esta especie era, hasta cierto punto, inocua, pero algunas cepas de *ovale* han mostrado severidad igual a la del *vivax*.

El óvalo de los glóbulos rojos franjeados en que se encuentran los parásitos, a los que se debe el nombre dado a la especie, no se ve en los frotis o extendidos, salvo cuando la humedad es elevada y los frotis se secan rápidamente. Los puntos de cromatina accesorios son tan frecuentes como en el caso del *vivax*. Se considera que el aspecto oblongo de las grandes masas de *cromatina* de los esquistos tiene importancia en el diagnóstico.

PARTE II

Preparación de portaobjetos

6. PREPARACIONES DE GOTAS GRUESAS

Los portaobjetos limpios se empaquetan en lotes de 5, 10 ó 15. El paquete de 5 es probablemente el más apropiado para los trabajos de campo (véase la Sección 16, Portaobjetos, pág. 71). Se rasga en diagonal uno de los extremos del paquete, dejando al descubierto los extremos de los portaobjetos (Diagrama 10 fig. 1). Se sacan dos de éstos y se colocan fuera del paquete. Se busca una superficie plana, limpia y clara. Si no se dispone de ninguna mesa, banco o silla, se puede utilizar un pedazo de cartón fuerte, que siempre se deberá tener a mano para este propósito. Si el piso u otra superficie disponible no es plana, se puede encomendar a un ayudante voluntario, entre los espectadores que nunca faltan, que sostenga el cartón. Cuando se extiende la sangre, es conveniente colocar un papel blanco liso debajo del portaobjetos. Se debe proporcionar a los principiantes un *modelo o guía*¹ para la posición, en el portaobjetos, de las gotas gruesas simples o múltiples.

La sangre se extraerá del lóbulo de la oreja, si es bastante carnoso, o bien del índice de la mano izquierda, o bien, si se trata de un lactante, del dedo gordo del pie. La punción se hará al costado del dedo más bien que en la yema, con una lanceta bien aguda, ya sea de las que se utilizan una sola vez, y de las que son de uso repetido. De estas últimas, las más usadas son las plumillas corrientes de acero, de diversa forma, con la mitad de la punta rota. Los tipos especiales de agujas de resorte raras veces son suficientemente agudas, y causan molestias que no guardan proporción con la importancia real de la operación. Para el trabajo diario continuo, merece tenerse en cuenta la cuchilla Bard-Parker N° 11. El borde romo de la cuchilla se inserta en la parte inferior de un pequeño corcho, que sirve de mango. Cuando no se utiliza, la punta debe insertarse en la parte superior de un corcho más grande de una botella de alcohol de boca moderadamente ancha, con una capacidad de 30 cc, ya que la cuchilla se oxida considerablemente si se la deja permanentemente en alcohol. Se puede mantener limpia y afilada si antes de los trabajos cotidianos, o cuando sea necesario, se frota con papel esmerilado N° 00 ó 000 (véase el Diagrama 10, figs. 2, 3 y 4).

Una hoja de este papel, de 4 x 6 cm, se enrolla en la botella de manera que la parte esmerilada quede junto al vidrio, y se sujeta con una goma, así estará constantemente a mano (fig. 3). La bo-

¹ Véase el Apéndice 5, págs. 103-104.

tella se llena de alcohol de 95 por ciento. Para limpiar la cuchilla, el papel esmerilado se extiende sobre el paquete de portaobjetos o sobre cualquier otra superficie firme y se frota en él la punta de la cuchilla, hasta que desaparezca todo resto de sangre seca, orín, etc., y el borde y la punta estén tan afilados que no se puedan ver fácilmente sin la ayuda de una lupa (fig. 4).

Con un algodón o gasa humedecidos en alcohol se limpia la parte en que se va a hacer la punción, restregando bien para quitar cualquier suciedad y sudor seco, y luego se frota nuevamente con un algodón o gasa secos (fig. 7). Conviene utilizar algodón de fibras largas más bien que el de calidad inferior, que tiene más hilachas. La gasa o una venda de tejido claro, cortada en pequeños pedazos, es probablemente la más satisfactoria. La cuchilla o la plumilla se humedece con alcohol, se seca (fig. 6) y se clava ligera y rápidamente en la piel; las primeras gotas de sangre se limpian con una gasa seca. Si la punción se hace en el dedo, el que practica la operación lo sujetará con la mano izquierda de una manera constringente. Después de la punción se aprieta suavemente la punta del dedo hasta que salga la sangre, formando una gota esférica sobre la piel seca (figs. 8, 9 y 10).

Inmediatamente, sosteniendo por el extremo un portaobjetos limpio, se apoya el borde del mismo contra el dedo índice del que efectúa la operación (fig. 11); luego se va inclinando suavemente el portaobjetos hacia el dedo del donante, hasta que la superficie del portaobjetos entre en contacto con la parte superior de la gota. La cantidad de sangre tomada determinará si se necesita otra gota, en cuyo caso se colocará esta segunda gota al lado de la primera. Se apoya rápidamente el portaobjetos sobre una superficie plana y lisa, de preferencia blanca, y, utilizando unos cinco milímetros de la esquina de un segundo portaobjetos, se extenderá la sangre (fig. 12) hasta formar un cuadro o rectángulo del espesor debido.

Si se ha de tomar más de una gota gruesa de sangre de la misma persona, cuando la piel se haya secado por completo, se puede recoger una gota fresca y extenderla directamente desde la esquina de otro portaobjetos limpio. A fin de evitar el traslado de sangre de una gota a otra, la esquina que se ha usado para extenderla debe limpiarse inmediatamente después de haber sido usada.

Con el resto de sangre que quede en el lugar de la punción se forma una capa más delgada de sangre o un frotis parcial delgado que se usa para la identificación (figs. 13 y 14) y en la que se puede escribir, una vez que se seque la sangre, con un lápiz blando de

PREPARACION DE MUESTRAS DE SANGRE

INSTRUCCIONES

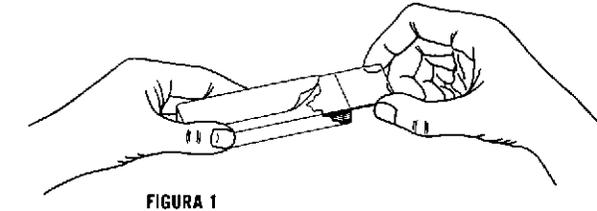


FIGURA 1



FIGURA 3



FIGURA 4

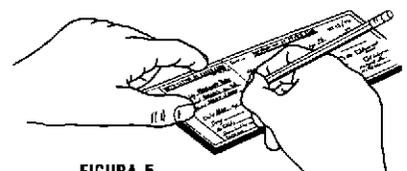


FIGURA 5

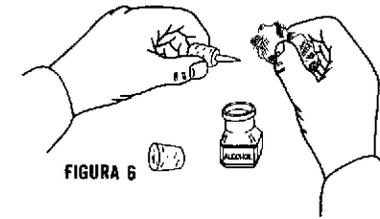


FIGURA 6

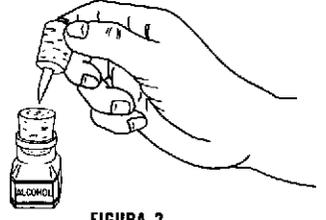


FIGURA 2

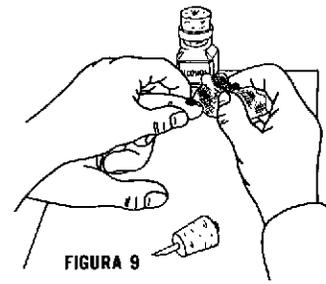


FIGURA 9

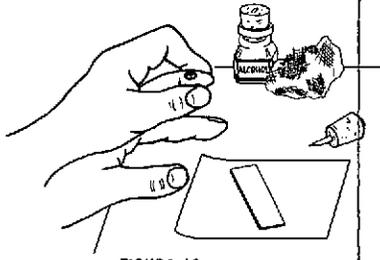


FIGURA 10



FIGURA 7

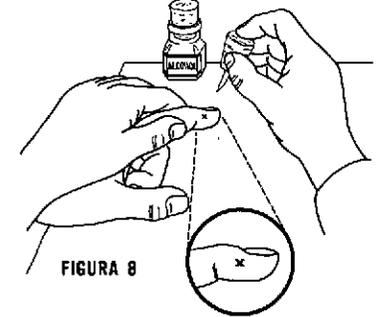


FIGURA 8

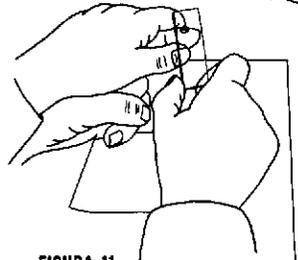


FIGURA 11

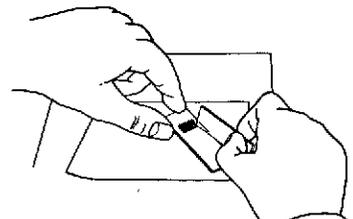


FIGURA 12

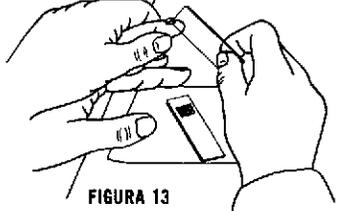


FIGURA 13

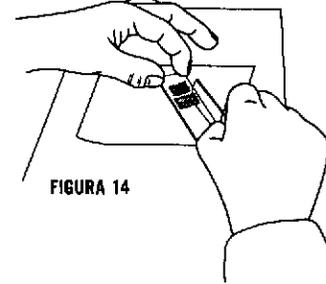


FIGURA 14

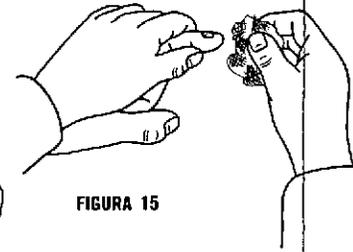


FIGURA 15

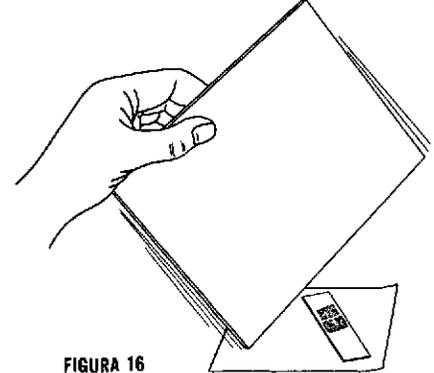


FIGURA 16

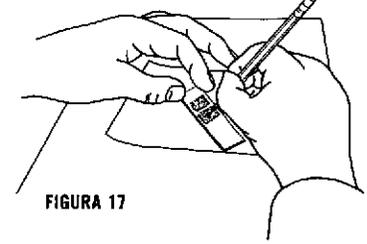


FIGURA 17

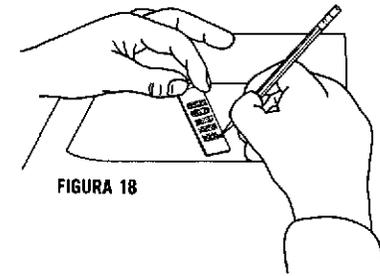
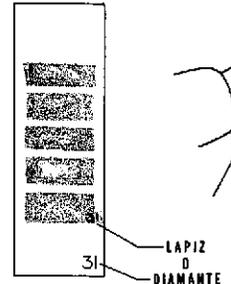


FIGURA 18



LAPIZ O DIAMANTE



FIGURA 19

Figura 1 Los paquetes de portaobjetos nuevos se abren rasgando el papel de la envoltura en uno de los extremos, procurando, en todo momento, sostener los portaobjetos por los bordes o por los extremos, con el dedo pulgar y el índice, a fin de no tocar las superficies.

Figura 2 Se puede utilizar como lanceta cualquier cuchilla puntiaguda limpia. La lanceta debe insertarse en la parte inferior de un corcho pequeño y, cuando no se use, la punta debe insertarse en la parte superior de un corcho más grande de un frasco de alcohol de boca moderadamente ancha, de 30 cc de capacidad, ya que la cuchilla se oxida considerablemente si se deja permanentemente en alcohol.

Figura 3 La botella que contiene la lanceta ha de llevar un pedazo de papel de esmeril sujeto con una liga. Este papel se utiliza para limpiar la lanceta y también para afilarla.

Figura 4 Para afilar la lanceta se coloca el papel de esmeril sobre un paquete de portaobjetos u otra superficie sólida y plana.

Figura 5 Facilítase toda la información requerida en la hoja de notificación de casos de fiebre, sin olvidar el número del puesto del colaborador y el número de serie de la muestra.

Figura 6 Limpíese la punta de la lanceta con un pedazo de gasa o algodón hidrófilo humedecido con alcohol. Colóquese la lanceta limpia sobre la mesa, permitiendo que el corcho descansa sobre uno de sus lados de tal manera que la punta de aquélla no toque lugar u objeto alguno.

Figura 7 Se limpia bien la piel alrededor del lugar donde se pretende hacer la punción, con un poco de gasa o algodón hidrófilo humedecido con alcohol y exprimido ligeramente para quitar el exceso.

Figura 8 Punciónese el dedo, en el lugar indicado con una "X", mediante un golpe rápido de la lanceta.

Figura 9 Limpíese cuidadosamente la primera gota de sangre del dedo con un pedazo de gasa o de algodón seco.

Figura 10 Presionando el dedo se hace salir otra gota de sangre.

Figura 11 Sosteniendo por el extremo un portaobjetos limpio, se apoya el borde del mismo contra el dedo índice de la mano izquierda que sujeta el dedo en que se ha hecho la punción; luego, se va inclinando suavemente el portaobjetos hasta que la mitad superior del mismo entre en contacto con la parte superior de la gota de sangre y una parte de ésta queda adherida a él; se debe evitar que el portaobjetos toque la piel. Si queda sangre suficiente en el dedo, se coloca en el portaobjetos una segunda gota más pequeña, que se sitúa a 5 mm debajo de la primera, anticipando así la operación de la fig. 13.

Figura 12 Colóquese el portaobjetos en una hoja de papel, cuidando que la sangre quede hacia arriba y, utilizando unos 5 mm del borde inferior de un segundo portaobjetos, extiéndase la sangre hasta formar un cuadro o rectángulo, e inmediatamente limpie la sangre del portaobjetos usado para extenderla.

Figura 13 Con la misma esquina del segundo portaobjetos, recójase otro poco de la sangre que haya quedado en el dedo.

Figura 14 Esta sangre, o la segunda gota mencionada en la fig. 11, se extiende a fin de usarla para escribir.

Figura 15 El dedo del enfermo se debe limpiar con un pedazo de algodón o gasa saturado con alcohol y, si continúa sangrando, se presiona la punción con un pedazo de algodón seco, hasta que deje de sangrar.

Figura 16 Para secar la sangre abaníquese el portaobjetos con una cartulina hasta que la sangre pierda el brillo.

Figura 17 Empleando el lápiz número 1 o un lápiz Dixon No. 2225, "Film Mark", escríbase en la segunda mancha de sangre el número del puesto del colaborador, el número de serie de la placa y la fecha en que fue preparada.

Figura 18 En los casos en que haya que tomar un gran número de muestras de distintas personas al mismo tiempo, se pueden colocar transversalmente en el mismo portaobjetos cinco gotas gruesas y estrechas. La sangre puede extenderse hasta uno de los bordes del portaobjetos, para indicar la muestra que se tomó primero. El número del paciente al que se tomó esta primera muestra sirve para identificar los frotis de todo el grupo del mismo portaobjetos y se marca al lado derecho de la primera gota o, mejor aún, si es posible, con ayuda de un lápiz de diamante, en el vidrio, en el ángulo inferior derecho del portaobjetos. Esos números han de terminar siempre en 1 ó 6.

Figura 19 Se pueden envolver en sus hojas de anotación uno o dos portaobjetos siempre que contengan sangre de una misma persona. También se pueden colocar juntos tres o más portaobjetos de distintas personas y empaquetar firmemente con una envoltura para portaobjetos. Las hojas de anotación se colocan, entonces, en torno al paquete compacto.

grafito del N° 1 o lápiz de "marcar películas".¹

Las gotas gruesas de sangre ya no se preparan con el grosor de antes, ni son agitadas o desfibrinadas. La densidad adecuada de una gota gruesa es, naturalmente, el espesor máximo a través del cual se puede ver bajo inmersión en aceite después de la coloración. Esto puede calcularse preparando primero una gota decididamente demasiado gruesa; ésta se extiende de manera insuficiente y el portaobjetos se coloca perpendicularmente o sobre su borde; se formará inmediatamente una gota que corre hacia el borde inferior. Con otro portaobjetos, se extiende más ampliamente una cantidad similar de sangre y se levanta de nuevo el portaobjetos. Si se forma la gota rápidamente, se extiende todavía más. Esto se repite hasta que la sangre recién extendida ya no corra hacia el borde inferior, sino que sólo se deslice muy lentamente.

La gota gruesa definitiva debe ocupar la mitad interior de los dos tercios del centro del portaobjetos, dejándose un espacio libre de 1,5 cm a cada extremo del portaobjetos para facilitar su manipulación mientras está todavía húmedo.

El lugar en que se escribe la identificación puede cubrirse con sangre que haya quedado un poco más tiempo en la superficie de la piel. Si el servicio de malaria no tiene ninguna clave o símbolo particular para identificar al donante, se inscribirán las iniciales de éste y la fecha con un lápiz blando del N° 1, utilizando la numeración romana para indicar el mes; por ejemplo: P M B 17 XII 3, (o sea el 17 de diciembre de 1963). Se necesita un dígito para el decenio únicamente en el caso de portaobjetos que se preparan para obtener especímenes permanentes.

Cuando la humedad sea alta, se puede abanicar el portaobjetos con una cartulina (fig. 16). Un "humigraph"² económico resulta útil para indicar los cambios de humedad que afecten el secado de los portaobjetos.

En el mismo portaobjetos se pueden colocar transversalmente cinco gotas gruesas estrechas, si así se desea (fig. 18), que se identificarán por el símbolo o número escrito con un lápiz del N° 1, en el extremo inferior de la primera gota, o se marcarán con un lápiz de punta de diamante en la esquina inferior derecha del portaobjetos. Asimismo, para indicar la gota que se extrajo primero, la sangre de ésta puede extenderse hasta uno de los bordes del portaobjetos.

¹ Véase el Apéndice 13, Lápices usados para hacer marcas en la sangre, pág. 112.

² A. Daigger and Co., 159 West Kinzie St., Chicago 10, Illinois (véase el Apéndice 14, pág. 113).

7. TEORIA DE LA COLORACION DE LA SANGRE

La coloración de la sangre ha sido siempre complicada por la gran variabilidad inherente al azul de metileno. Virtualmente todos los colorantes de la sangre se derivan originalmente del azul de metileno preparado de diversas maneras. Cuando se sabe que se pueden obtener resultados sumamente variables, incluso empleando los mismos lotes de azul de metileno e idénticos procedimientos, resulta evidente que la misma variación se logra con la coloración de Giemsa, de Wright o de Leishman. En algunos casos, la diferencia suele ser tan grande que inutiliza algunos lotes de colorantes.

En 1925 se constituyó en los Estados Unidos de América la Comisión de Coloración Biológica, a fin de ensayar cada lote de colorante con el propósito de eliminar los que resultaren poco satisfactorios. Por lo tanto, al adquirir colorantes para sangre, fabricados en dicho país, es muy conveniente buscar uno que tenga un número de certificación de la Comisión de Coloración, lo que asegura que, por lo menos en el momento en que se ensayaron, los resultados fueron satisfactorios.

Con respecto al colorante de Giemsa, de máxima utilidad en las actividades de erradicación de la malaria, algunos laboratorios todavía preparan sus colorantes con los componentes usados originalmente, a menudo con muy buenos resultados. Sin embargo, se aconseja al principiante que, salvo en circunstancias excepcionales, no trate de utilizar este método, porque no siempre es satisfactorio. Aunque en el mercado mundial se dispone de numerosos colorantes de Giemsa, todos buenos y a veces excelentes, no es posible recomendar con seguridad uno especial. El procedimiento más seguro consiste en obtener pequeñas muestras (1 a 5 gm), por lo menos de tres fuentes distintas, que se deben ensayar extensa y repetidamente con las técnicas y en las condiciones de la localidad. Sólo entonces puede hacerse un pedido en gran cantidad.

Esto puede explicar la firme confianza que algunos investigadores de larga experiencia tienen en marcas o tipos determinados de colorantes y puede explicar también, por qué es posible que algunos colorantes de Giemsa den resultados satisfactorios si se disuelven en una marca de alcohol metílico puro, y son manifiestamente menos satisfactorios con otras marcas. Los elementos disueltos se encuentran evidentemente en un equilibrio químico tan delicado que cambios de reacción muy débiles pueden producir resultados sorprendentes.

El constituyente básico del colorante de la sangre consiste en algún tipo de eosinato de azul de metileno disuelto bien sea en alcohol metílico puro o en una proporción igual por peso de ese alcohol y glicerina pura. Generalmente, el alcohol metílico está libre de acetona, pero no todos los alcoholes libres de acetona dan resultados satisfactorios. Esta solución alcohólica de colorante de Giemsa es sólo un medio conveniente para preparar la solución acuosa que, en realidad, colorea los elementos rojos, azules y violeta de la sangre. Es poco probable que los elementos disueltos permanezcan en solución más de 45 a 90 minutos, tiempo en el que comienzan a precipitarse y desprenderse de la solución. Esto tiene importancia en dos sentidos: 1) todas las soluciones de Giemsa se deben preparar inmediatamente antes de usarlas, y 2) si el agua contamina la solución alcohólica madre, se precipitarán de ésta valiosas porciones de elementos de coloración, en proporción a la cantidad de agua presente. Los resultados de la introducción diaria de una pipeta húmeda en la solución madre, pueden ser desastrosos. La contaminación acuosa del colorante alcohólico madre es la más frecuente y sutil debido a la inherente capacidad de los alcoholes puros para absorber humedad. Esto puede ocurrir muy rápidamente en los trópicos, donde la humedad es elevada. Este hecho dio origen a la antigua creencia de que generalmente los colorantes de la sangre se deterioran en los trópicos. Por lo tanto, los tapones de rosca de las botellas se deben apretar a intervalos, y los tapones de corcho se deben renovar cuando pierdan elasticidad. En caso de usar tapones de vidrio esmerilado, se deben limpiar cada vez que se hayan de tapar los frascos, para evitar que el polvo de colorante impida cerrarlos herméticamente.

A fin de impedir este deterioro invisible y continuo del colorante de Giemsa, es conveniente usar botellas pequeñas cuya capacidad sea suficiente para uno o dos días de trabajo. Cuando no se disponga de cuentagotas de plástico, se puede usar el pequeño tubo antiguo de ensayo, amarrado a la botella de ensayo, pero no es un sustituto adecuado. Las pequeñas botellas de plástico con cuentagotas, y herméticamente cerradas con tapas de rosca, como las utilizadas para perfumes y algunas medicinas, son ideales para trabajar con el colorante Giemsa.¹ Las botellas que contienen la solución madre sólo se abrirán cuando sea necesario llenar de nuevo las botellas de uso diario.

¹ Véase el Apéndice 12, Cuentagotas de plástico, pág. 112.

Las mismas precauciones descritas para el colorante de Giemsa, se deben adoptar con todos los otros tipos de colorante Romanowsky, como los de Wright y Leishman, aunque ordinariamente no se use glicerina. *Estos colorantes se disuelven en alcohol metílico puro en la proporción de 0,15-0,18 gm por 100 cc de alcohol metílico puro*, mientras que el de Giemsa se mezcla como sigue:

Colorante de Giemsa en polvo (certificado)	0,75 gm
Alcohol metílico puro	65,0 cc
Glicerina pura	35,0 cc

A falta de colorante de Giemsa, a veces se obtienen excelentes resultados usando los polvos de Wright o de Leishman *en la misma concentración del de Giemsa*, y, naturalmente, con la misma técnica.

Durante mucho tiempo, el método recomendado para la preparación de los colorantes ha sido el de mezclarlos en un mortero. La pulverización prolongada con glicerina o alcohol metílico, o con ambos, sigue siendo un procedimiento corriente. Es probable que esto pueda hacerse sin mayores consecuencias, en los climas secos; pero con este método la exposición a la atmósfera es demasiado prolongada. Además, invariablemente se adhieren terrones de polvo colorante húmedo a los lados del mortero y al triturador. En lugar de este método, el procedimiento que desde hace varios años se ha utilizado con resultado satisfactorio ha consistido en colocar el polvo seco directamente en una botella de tamaño apropiado que contenga la cantidad adecuada de la mezcla de alcohol-glicerina. En la botella también se introducen un mínimo de 50 cuentas de vidrio macizo, de pequeño tamaño, cuyo diámetro no exceda de 5 mm y que estén perfectamente limpias. Esta botella se agita intensamente a intervalos determinados, 6 a 10 veces al día, durante un mínimo de 3 días. Después se extraen diariamente pequeñas muestras, que se filtran a través de un papel de filtro de grosor medio y se ensayan con sangre fresca. Cuando todos los elementos de la sangre aparezcan en sus colores apropiados, se filtra una cantidad suficiente del colorante para una o dos botellas, y así, queda listo para su uso; la cantidad restante del colorante se almacena sin filtrar hasta que se necesite. En razón a la posible variación de los distintos ingredientes, la botella con solución madre debe llevar una

etiqueta grande en la que se enumerarán cuidadosamente su nombre, número del lote, y la cantidad de cada uno de ellos, así como la fecha de la preparación.

Hay que insistir en que *todos los envases que contengan colorante líquido deben mantenerse herméticamente cerrados en todo momento*. Si se siguen cuidadosamente las instrucciones antes citadas, se observará que, con el tiempo, esos colorantes mejoran, en lugar de deteriorarse, bien sea "en los trópicos" o en cualquier otra región.

Diluentes. Como solamente las soluciones acuosas recién hechas de colorantes de la sangre dan a las preparaciones los colores conocidos, tiene mucha importancia la clase de diluyente que se utilice. En la coloración de la sangre se han empleado como diluentes, en diversas ocasiones, las siguientes clases de agua: agua de pozo, de manantiales, arroyos y ríos y de abastecimientos de agua por cañería, así como agua destilada, agua de lluvia, e incluso agua destilada dos y tres veces, y por último, agua amortiguada o tamponada y agua neutralizada. Cuando escasea provisionalmente el agua destilada, se pueden agregar sales amortiguadoras al agua de grifo. Esta combinación nunca reemplazará el empleo del agua destilada. El agua de lluvia recogida en un recipiente limpio de superficie lisa de porcelana u otro material, a medio metro sobre el nivel del suelo, es agua destilada.

Hay que señalar que no es posible establecer una reacción que resulte adecuada para todas las coloraciones. *La prueba definitiva de la adaptabilidad o reacción del diluyente consiste únicamente en la apariencia de la sangre vista a través de los oculares del microscopio*. Por lo tanto, se debe utilizar cualquier combinación que, de un modo constante, proporcione buenos resultados, por poco ortodoxa que pueda parecer. En algunas zonas donde el agua subterránea pasa a través de bosques y prados, y terrenos arenosos o arcillosos y rocas, el agua de grifo puede resultar sumamente conveniente para dicha finalidad. Por otra parte, cuando el agua pasa a través de rocas porosas y yesosas, o piedra caliza, puede ser inservible. El agua que haya adquirido bacterias aerógenas, fermentos o algas puede resultar igualmente inadecuada, a menos que como consecuencia de hervirla durante cinco minutos, de filtrarla y sedimentarla, recupere su claridad. Se deben descartar todas las aguas que no sean cristalinas.

La adición de sales amortiguadoras al agua diluyente produjo inmediatamente, en la mayoría de los casos, un notable mejoramiento

de la calidad de las preparaciones para la coloración de la sangre. En general, la reacción de los diluentes que produjeron esa mejora en la calidad, se acercaba al punto de neutralidad (pH 7,0). La experiencia ha demostrado que no hay un pH estándar para todos los tipos de colorantes y que se debe buscar la reacción más adecuada para la coloración que se desea. En la práctica, la mediana varía generalmente entre pH 6,6 y 7,4 que coincide con la escala del indicador rojo de fenol.

El fosfato de sodio (Na_2HPO_4) y el fosfato de potasio (KH_2PO_4) son las sales amortiguadoras de uso corriente. Debido a que el fosfato de sodio cristalino contiene 12 moléculas de agua de cristalización, al quedar expuesto al aire, no tarda en cubrirse de polvo blanco, por lo que no es posible determinar su peso exacto. Cuando se mezcla con otros cristales, se forma una masa húmeda. Por lo tanto, es indispensable especificar que el fosfato monohidrógeno de sodio sea *anhidro*; el fosfato dihidrógeno monopotásico puede mezclarse así con la sal de sodio anhidra en cualquier proporción y sigue permaneciendo seco. En la práctica, se pueden preparar rápidamente soluciones amortiguadoras eficaces agregando un gramo de una mezcla de las sales de sodio y de potasio a cada litro de agua destilada en la proporción de 6 a 5 o *en cualquier otra que haya resultado satisfactoria*. Se mezclan perfectamente las cantidades correctas de esas sales y se pulverizan en un mortero, y el polvo homogéneo se pesa en lotes de 1 gramo (o más) y se coloca en pequeños tubos herméticamente cerrados o, si se va a utilizar inmediatamente, se puede envolver en papel glasina, o disolver en pequeñas cantidades de agua.

Para la coloración adecuada de los frotis o extendidos de sangre, el agua destilada debidamente neutralizada para esta finalidad, puede resultar mejor que las aguas amortiguadoras. La preparación se hace neutralizando el agua destilada a un indicador rojo de fenol con un álcali débil, como el carbonato de litio al 0,2 por ciento. Se agita repetidamente (un mínimo de 50 veces) hasta que el color deseado se mantenga por lo menos durante 20 minutos, y entonces puede usarse con colorantes de Wright o Leishman. Esta agua neutralizada no sólo es usada como diluyente del colorante alcohólico, sino que también deberá utilizarse para el enjuague final. Las sales amortiguadoras actúan como una especie de material químico elástico para inactivar (dentro de una esfera limitada) diversas cantidades de ácido y álcali. Por otra parte, la neutralización es una reacción química fija que no permite variaciones.

8. TECNICAS DE COLORACION EN GENERAL

Los frotis se preparan extendiendo una gota muy pequeña de sangre fresca con el borde de un portaobjetos nuevo, liso y sin despostillar. El espesor óptimo que se ha de obtener debe consistir en una capa de células sanguíneas, del mismo espesor que el de una célula; en contraste, la gota gruesa puede contener de 6 a 20 veces esa cantidad de sangre, extendida sobre un área aproximadamente rectangular de 1,5 por 1,2 cm.

En el frotis de sangre, una sola capa de células se extiende horizontalmente sobre la superficie del vidrio. La gota gruesa de sangre contiene numerosas capas de células en su acostumbrada formación de "rouleaux" (pilas de monedas) y el eje de una célula puede estar en cualquier dirección. La coloración de la capa plana de las células en el frotis o extendido de sangre tiene por objeto demostrar, con el máximo detalle, las células sanguíneas y su contenido. Por lo tanto, esas preparaciones son "fijadas" mediante la aplicación de alcohol metílico puro, a fin de retener la hemoglobina de las células y de que puedan ser coloreadas. Es relativamente fácil ver a través de una sola capa de glóbulos rojos coloreados.

Si se "fijaran" así los glóbulos rojos de la sangre contenidos en la gota gruesa, no se podría ver nada, salvo en los bordes extremos. Es necesario, por lo tanto, retirar la hemoglobina de las células rojas, utilizando algunos de los diferentes métodos, separadamente o durante el proceso de coloración. Antes se utilizaban soluciones débiles de ácido hidroclicó, agua destilada o bien otras mezclas, para retirar la hemoglobina antes de agregar el colorante de la sangre. Esto producía frecuentemente no sólo una ruptura completa de las células rojas de la sangre, sino también deterioro parcial, lisis y deformación de los parásitos, leucocitos y otros elementos de la sangre. Después se estableció el método de efectuar la deshemoglobinización en la solución colorante.

El primer paso en la coloración de los frotis o extendidos es la fijación, que se opone diametralmente al principio de la coloración de gotas gruesas.

Tanto el tiempo como el calor tienden a "fijar" la hemoglobina en los glóbulos rojos ya sea en frotis o en gotas gruesas. Por lo tanto, es evidente que cuanto más rápidamente se colorean las gotas gruesas, más completa será la deshemoglobinización, y mientras

mayor tiempo estén sin colorear, menos claras resultarán las preparaciones. En un clima cálido y húmedo pueden bastar de 7 a 10 días para que una gota gruesa de sangre resulte inadecuada para el examen, después de la coloración. Por otra parte, los frotis o extendidos pueden presentar una apariencia bastante buena.

Para demostrar lo que sucedería si se "fijaran" las gotas gruesas, basta con verter alcohol metílico puro sobre la mitad inferior de una gota sostenida perpendicularmente, y exponerla a la técnica corriente de coloración para gotas gruesas.

Gotas gruesas. La coloración original de las gotas gruesas consistía en cubrir una gota espesa bastante grande con azul de metileno diluido. Como prácticamente no existía visibilidad en la parte central, se pensó que si se agitara bien la sangre, el examen sería más fácil. Siguió un largo período en el que se consideró imprescindible la desfibrinación, aun cuando un poco menos de sangre en la gota hubiera producido el resultado deseado. Desde entonces, *se ha usado casi exclusivamente la coloración de Giemsa y se ha generalizado la dilución de una gota de la solución madre en 1 cc de agua destilada.* Los portaobjetos con gotas gruesas se colocaban a través de unas varillas de vidrio y la dilución de colorantes de Giemsa se vertía sobre ellos, dejando que ejerciera su acción durante una hora aproximadamente, después de lo cual ya estaban listos para examinar. Las cantidades mayores se coloreaban, apoyadas verticalmente en los bordes o en los extremos, en vasos o cajas de coloración rectangulares de mayor o menor profundidad.

En 1929, Barber y Komp colocaron las gotas gruesas en un extremo de los portaobjetos y los separaron por medio de una pieza de cartón bastante gruesa, de 2,5 cm cuadrados, situada en el otro extremo. Por este procedimiento, se podrían colorear simultáneamente grupos de 25 a 50 portaobjetos, colocándolos verticalmente en una caja de coloración; de aquí surgió la práctica de colocar la gota gruesa de sangre en el extremo del portaobjetos. Si en uno de los portaobjetos de tales grupos existía una infección de *falciparum* muy acentuada, debida principalmente a la debilitación de la sangre, algunas partes de ésta que contenían parásitos, ocasionalmente contaminaban los portaobjetos contiguos. El enjuague cuidadoso o el empleo de un detergente puede evitar este inconveniente.

Después del descubrimiento hecho por Pampana, en relación con

la acción deshemoglobinizante de las soluciones isotónicas de azul de metileno, Field creó su método de coloración rápida para gota gruesa, que fuera usado tan extensamente durante la Segunda Guerra Mundial. Este consistía en una sumersión de uno a tres segundos en solución A (una mezcla de azul de metileno y fosfatos), seguida de un enjuague breve en agua destilada, y una sumersión similar en solución B (una mezcla de eosina y fosfatos). La rapidez con que se realizaba el método no daba tiempo para una deshemoglobinización completa, pero mostraba tanto leucocitos como parásitos, coloreados con claridad y brillantez. Una variación de esta misma coloración se desarrolló en la India, y es conocida como coloración J.S.B.

Entre 1920 y 1930, un fabricante de equipos, en Londres, diseñó un dispositivo para coloración, ligeramente curvo, de tal manera que cuando en su curva se colocaba un portaobjetos invertido quedaba debajo del mismo un espacio que no excedía de 3 mm de profundidad, en el cual se vaciaba el colorante. Debido al peso característico de la molécula de hemoglobina, esta posición invertida de la gota gruesa permitía una deshemoglobinización total en comparación con las otras posiciones en las que los portaobjetos habían sido coloreados anteriormente. La sumersión de la lámina durante un solo segundo, en un fosfato de azul de metileno, preservaba en gran parte los elementos celulares de la sangre sin interferir en la deshemoglobinización. Cuando la solución de Giemsa era vertida bajo el portaobjetos colocado en la placa curva o en el dorso de una bandeja rectangular esmaltada, como la que muestra el Diagrama 12-E (pág. 48), se descubrió que este tratamiento con azul de metileno facilitaba la coloración después de la exposición de sólo 6 a 10 minutos a la solución de Giemsa.

La coloración de la combinación de gota gruesa-extendido requiere que el extendido sea "fijado" por separado con alcohol metílico antes de que la lámina sea coloreada, con alguna variación de las técnicas antes mencionadas.

Los extendidos solos pueden ser coloreados con Giemsa después de haber sido "fijados" previamente, o con colorantes de May-Grünwald, de Wright o de Leishman, con los cuales se obtiene la fijación aplicando primero el colorante sin diluir y después el diluyente.¹

¹ En el Apéndice 9, pág. 106, se da información adicional sobre la coloración de frotis o extendidos.

9. TRATAMIENTO PREVIO DE GOTAS GRUESAS

Cuando las láminas de gota gruesa se demoran en llegar a las personas que pueden usar debidamente la técnica de coloración de Giemsa, es necesario tratarlas previamente. Primero, las láminas se sumergen por un segundo en la solución de azul de metileno fosfatado, o simplemente se vacía el azul sobre la sangre (Diagrama 11, fig. 4). Segundo, la duración del enjuague en agua amortiguadora debe ser mayor que en el caso de la técnica completa de coloración, pero solamente hasta que el borde del frotis se vuelva ligeramente gris azulado. El lavado no se ha de llevar a tal extremo que el color rojo desaparezca de cada parte de la gota. Tercero, hay que dejar que el agua se escurra del portaobjetos y éste debe secarse al calor suave, o al sol, para evitar el crecimiento de hongos. En cuarto lugar, los portaobjetos deben envolverse en paquetes de 15 o menos, identificando su contenido en la parte exterior, con un lápiz suave, siempre en los bordes y no en el lado plano del portaobjetos. Quinto, es preciso guardarlos en un lugar seco hasta que, finalmente, puedan ser coloreados con una solución de Giemsa recién preparada. Como es imposible lograr una mayor deshemoglobinización, de nada sirve invertirlos. De 5 a 10 minutos suelen ser suficientes para la coloración con Giemsa. El tiempo mínimo necesario se ha de determinar mediante ensayos.

En el Diagrama 11 se explica cómo pueden tratarse unas pocas láminas en la casa de un colaborador, y se describe cada una de las medidas adoptadas. En el caso de numerosas láminas, las medidas se reducen a las indicadas en el Diagrama 12 (A y B); las láminas se mueven suavemente hacia adelante y hacia atrás en la segunda agua amortiguadora hasta que queda sólo un vestigio de color rojizo.

Los portaobjetos que han sido pobremente coloreados pueden ser vueltos a colorear de varios modos, algunas veces con éxito considerable. Sin embargo, no se ha ideado todavía una técnica que por sí sola dé siempre resultados satisfactorios.

Actualmente existen frascos plásticos de goteo cuya capacidad es de 30 a 150 cc (véase el Apéndice 12, pág. 112). Al ser introducido en dichos frascos, el colorante de Giemsa se encuentra mucho mejor protegido contra la contaminación con humedad que en cualquier recipiente que requeriría una pipeta separada para secar el número apropiado de gotas. Por lo tanto, *el personal de evaluación podrá*

TRATAMIENTO PREVIO DE LAMINAS DE GOTA GUESA POR LOS COLABORADORES VOLUNTARIOS

Figura 1

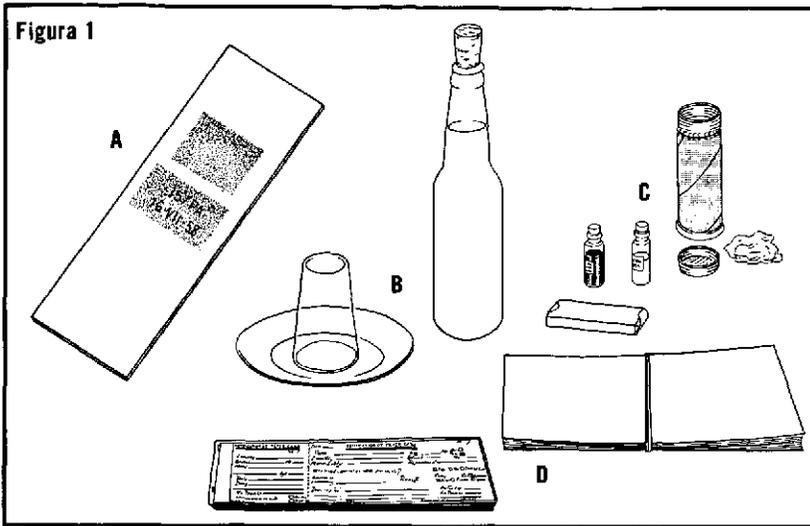


Figura 1

- A. Aspecto de la gota gruesa antes del tratamiento previo.
- B. Equipo sencillo que usa el colaborador para tratar previamente las gotas gruesas con una solución fosfatada de azul de metileno. Consiste en una botella bien enjuagada que contenga 300 cc de agua destilada o de agua de lluvia, un vaso pequeño y un platillo pequeño.
- C. El cartucho de envío postal que, cuando se devuelve al colaborador, contiene frascos pequeños de solución fosfatada de azul de metileno y sales amortiguadoras y un paquete de tres portaobjetos.
- D. Bloc de hojas para la notificación de casos y un paquete de papel para envolver portaobjetos.

Figura 2

Viértanse las sales amortiguadoras (el polvo blanco) en la botella de agua.

Figura 3

Una vez disueltas las sales, llénese con este líquido unas tres cuartas partes del vaso. El agua con sales amortiguadoras puede utilizarse hasta que se enturbie.

Figura 4

Sujetando el portaobjetos formando un ángulo de 20° sobre el platillo, viértase rápidamente sobre aquél suficiente solución fosfatada de azul de metileno (solución azul) hasta cubrir la sangre. Un segundo es suficiente para que actúe la solución azul.

Figura 5

Sumérjase inmediatamente el portaobjetos en el vaso que contiene la solución amortiguadora.

Figura 6

Muévase suavemente el portaobjetos de un lado a otro en la solución amortiguadora, hasta que sólo el borde de la placa de gota gruesa de sangre pierda el color rojo. Cuando la solución se vuelva de un color azul fuerte, sustitúyase el líquido por solución nueva de la botella.

Figura 7

Apóyese el portaobjetos contra cualquier objeto adecuado, para que se seque. En la figura se puede ver el portaobjetos tal como aparece después del tratamiento (bastante transparente).

Figura 8

Envoltura del portaobjetos en su hoja de notificación.

Figura 9

Colóquese el portaobjetos envuelto dentro del tubo de envío postal, para remitirlo al laboratorio, usando la envoltura en caso necesario.

Figura 2

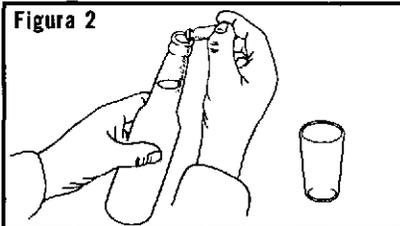


Figura 3

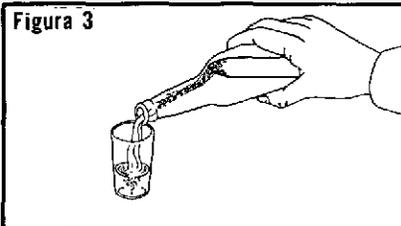


Figura 4

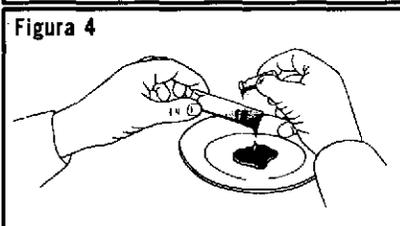


Figura 5

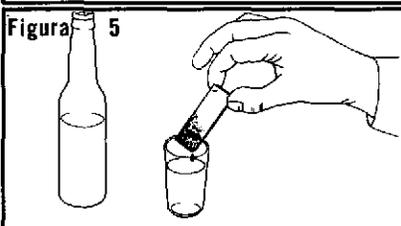


Figura 6

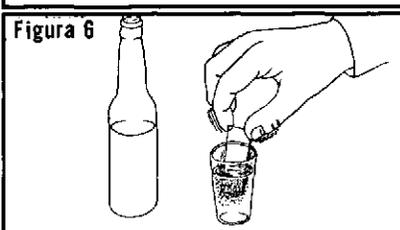


Figura 7

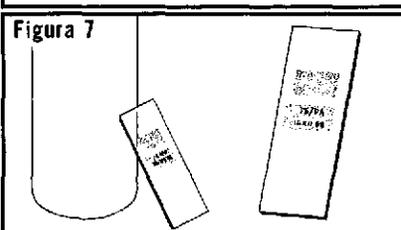


Figura 8

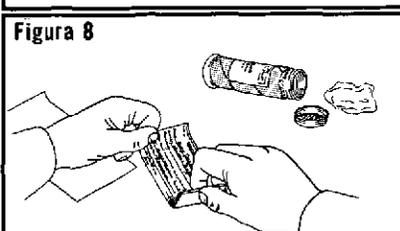
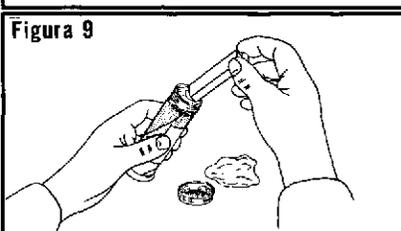


Figura 9



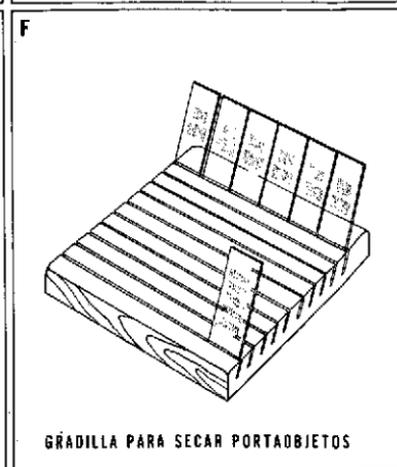
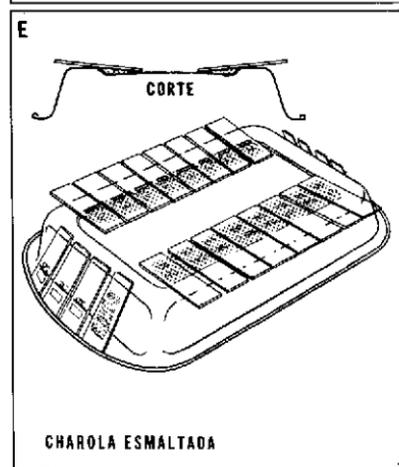
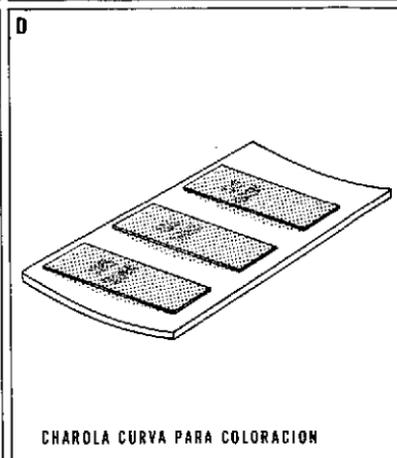
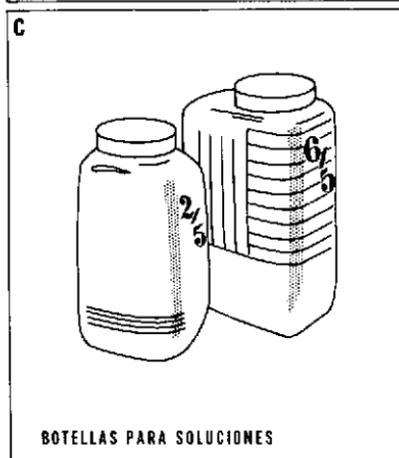
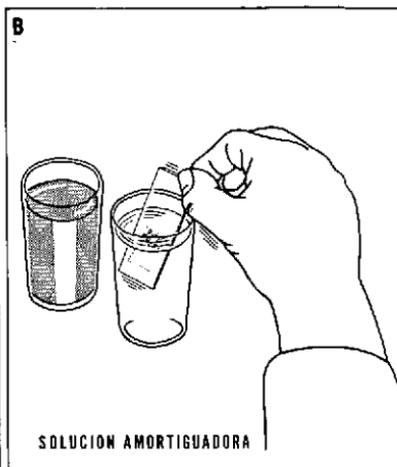
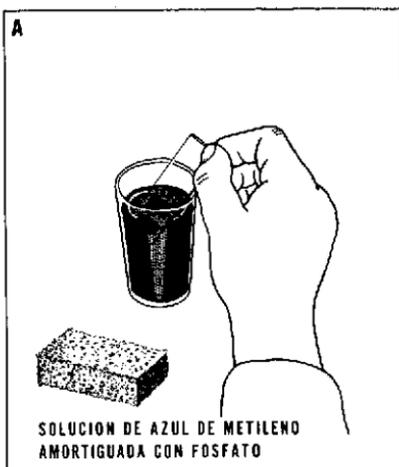
ser equipado para colorear las láminas en el campo, y los colaboradores sólo necesitarán hacer el tratamiento previo de láminas. Lo único que se necesitaría para equipar al personal de evaluación, además de lo ya recomendado, es un pequeño abastecimiento adicional de agua amortiguadora y una superficie limpia con una depresión, según puede verse en el Diagrama 12-E. Todas las láminas tomadas por el personal de evaluación pueden, de esta forma, ser coloreadas en el campo una vez que se haya acumulado un número adecuado de ellas diariamente o cada dos días. Este método proveerá a los microscopistas con *la mejor preparación posible para el examen*.

Observaciones. La proporción de polvo de colorante requerida es sólo un promedio y la cantidad puede variarse de acuerdo con los resultados obtenidos. Por ejemplo, si algún colorante de Giemsa da buen resultado cuando ha sido disuelto en cierta proporción con glicerina y alcohol, esas cantidades podrán ser aceptadas. Cuando la solución alcohólica es demasiado fuerte y los leucocitos están ligeramente sobrecoloreados, 5 ó 6 gotas en 10 cc de diluyente pueden ser suficientes. Es mejor diluir el colorante con una cantidad mayor de mezcla de alcohol y glicerina, a fin de mantener la proporción universal de una gota de solución alcohólica de colorante por 1 cc de solución amortiguadora.

Del mismo modo, con las soluciones amortiguadoras se debe procurar encontrar la proporción de sales que dé resultados óptimos. Se prepara una serie de soluciones con diferentes cantidades de fosfato de sodio y fosfato de potasio, en las siguientes proporciones: 2:5, 4:5, 6:5, 8:5 y 10:5. Se colorean varias preparaciones de la misma sangre con el colorante de Giemsa, usando la solución amortiguadora de 1 gramo de cada una de estas proporciones con un litro de agua destilada. Se eligen las proporciones que den los mejores resultados. La proporción de 6:5 será probablemente la preferida.

10. TECNICAS DE COLORACION DETALLES

Las gotas gruesas se solían teñir únicamente con colorante de Giemsa. Los portaobjetos se colocaban hacia arriba sobre varillas de vidrio a una distancia de 5 cm una de otra, y cuidadosamente nive-



ladas; se vertía sobre los portaobjetos solución de Giemsa fresca, 1 gota a 1 cc de agua destilada o amortiguada, dejándose actuar durante 30 a 60 minutos. Después, se enjuagaban con el mismo diluyente, se escurrían y se secaban al calor.

Para colorear portaobjetos con colorante de Giemsa se disponía de vasos de Coplin y cajas de coloración rectangulares, y los bloques de portaobjetos arriba mencionados se coloreaban del mismo modo.

El tiempo de coloración varía con cada lote de colorante y debe ensayarse minuciosamente. La deshemoglobinización no es tan completa con el método de Field (véase pág. 51) como con la técnica de azul de metileno de Giemsa, pero los colores en los márgenes de la gota gruesa son aproximadamente los mismos con los dos métodos.

Coloración de las Gotas Gruesas (Walker) **(Diagrama 12)**

1. Compruébese minuciosamente la identificación de la lámina. Utilícese un lápiz blando de grafito del N° 1 para correcciones o cualquier anotación. No debe usarse un lápiz grueso.
2. Sumérjase el portaobjetos durante un segundo—no más—(dígame mentalmente: "ciento uno") en la solución de azul de metileno fosfatado. Para no cambiar tantas veces el agua amortiguadora después de sumergir el portaobjetos en solución de azul de metileno fosfatado, el extremo libre del portaobjetos debe ponerse en contacto con una esponja plástica bien mojada y escurrida, a fin de eliminar rápidamente el exceso de azul.
3. Sumérjase cinco veces en solución amortiguadora (1 gm de la mezcla en la proporción 6:5 de las sales amortiguadoras por litro de agua destilada), como se usa para diluir el colorante de Giemsa. Usense dos recipientes de boca ancha, de cristal, para más de 10 láminas y cámbiese la solución cuando empiece a ponerse demasiado azul. (Si no se dispone de agua destilada por el momento, se pueden agregar sales amortiguadoras al agua de grifo.)
4. Colóquense las láminas "hacia abajo" sobre la depresión de 2-3 mm de una placa curva para coloración o de una charola esmaltada.

5. Déjese deslizar solución de Giemsa recientemente preparada (1 gota a 1 cc de solución amortiguadora) por debajo del portaobjetos hasta que llene la depresión. Quítense las burbujas que se formen en la gota gruesa o cerca de ella.
6. Déjese actuar el colorante durante 6-10 minutos.
7. Sumérjase rápidamente el portaobjetos en solución amortiguadora, para eliminar el exceso de colorante de Giemsa.
8. Escúrrase y séquese el portaobjetos al calor.
9. Examínese con objetivo de inmersión.

Preparación de varias soluciones para el diagnóstico de la malaria

1. *Fosfato de azul de metileno*

Azul de metileno, medicinal	1,0 gm
Ortofosfato disódico, anhidro (Na_2HPO_4)	3,0 gm
Ortofosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1,0 gm

Se mezclan completamente en un mortero seco y se colocan cantidades de un gramo en frascos pequeños bien taponados. El contenido de un frasco se disuelve en 250-350 cc de agua destilada o filtrada si es necesario.

2. *Colorante de Giemsa, certificado, líquido, o*

Colorante de Giemsa en polvo, certificado	0,75 gm
Alcohol metílico puro	65,0 cc
Glicerina pura	35,0 cc

Agítese bien en una botella con cuentas de vidrio de 6-10 veces al día hasta que todo quede completamente mezclado. Manténgase siempre bien taponado. Si no se puede disponer de polvo de Giemsa, se puede utilizar polvo de Wright en la misma proporción. No se necesita calor; úsese aproximadamente el tercer día o tan pronto como los ensayos diarios con sangre normal demuestren que es satisfactorio. Filtrese sólo cuando sea necesario, cada vez que se vuelva a llenar el frasco plástico.

3. *Agua amortiguadora*

Ortofosfato disódico, anhidro (Na_2HPO_4)	6,0 gm
Ortofosfato monopotásico (KH_2PO_4)	5,0 gm

Mézclase totalmente en un mortero 1 gm de mezcla para 1.000 cc de agua destilada.

4. *El colorante de Field consiste en dos soluciones acuosas:*

Solución A:

Azul de metileno	0,8 gm
Azur 1 = Azur A	0,5 gm

Disuélvase en 500 cc $\frac{4}{5}$ de agua amortiguadora.

Solución B:

Eosina amarilla s.a.	1,0 gm
----------------------	--------

Disuélvase en 500 cc $\frac{4}{5}$ de agua amortiguadora.

Para colorear, suméjase el portaobjetos durante un segundo (1-3 seg.) en la solución A; lávese suavemente en agua destilada o amortiguadora; suméjase durante dos segundos (1-4 seg.) en la solución B; después se lava suavemente, se deja escurrir y se seca.

5. *Colorante de Wright, certificado, líquido, o*

Colorante de Wright, en polvo, certificado	0,15-0,18 gm
Alcohol metílico puro	100 ml

Agítese bien en una botella con cuentas de vidrio y manténgase perfectamente taponado en botellas pequeñas. Fíltrese si es necesario.

PARTE III

Examen microscópico

11. MICROSCOPIOS

En los programas de erradicación de la malaria se utilizan tres clases de microscopios:

1. El microscopio compuesto (monocular o binocular);
2. El microscopio estereoscópico;
3. La lupa o lente de mano con un aumento de 2x a 10x.

La lupa, que se considera principalmente como un instrumento para los trabajos de entomología, resulta de gran utilidad para el examen de las diversas partes del microscopio compuesto, tales como las roscas de tornillo gastadas, cremalleras deterioradas, y partículas endurecidas de aceite y polvo en superficies lisas o de cristal. El microscopio estereoscópico, instrumento estándar para todo programa de erradicación de la malaria, puede usarse también cuando se desea un mayor aumento. Una lupa de 5x es indispensable para el examen de objetivos cuya claridad de detalle es débil.

Los microscopios compuestos están provistos de soportes monoculares o binoculares. Algunos fabricantes suministran también, con estos últimos, un tubo monocular.

Según puede observarse en el Diagrama 13, el cuerpo monocular consiste en un solo tubo. Por razones de comodidad, se suele inclinar el microscopio monocular sobre su base, dando al ocular una dirección semejante a la de los binoculares. Cuando sólo se dispone de monoculares, es conveniente suministrar tubos monoculares inclinados. Si éstos tienen una ampliación de 1,5x, debe usarse un ocular proporcionalmente más débil.

Un cuerpo binocular inclinado (Diagrama 14) permite al observador utilizar el microscopio durante períodos prolongados con mucho menos

DIAGRAMA 13

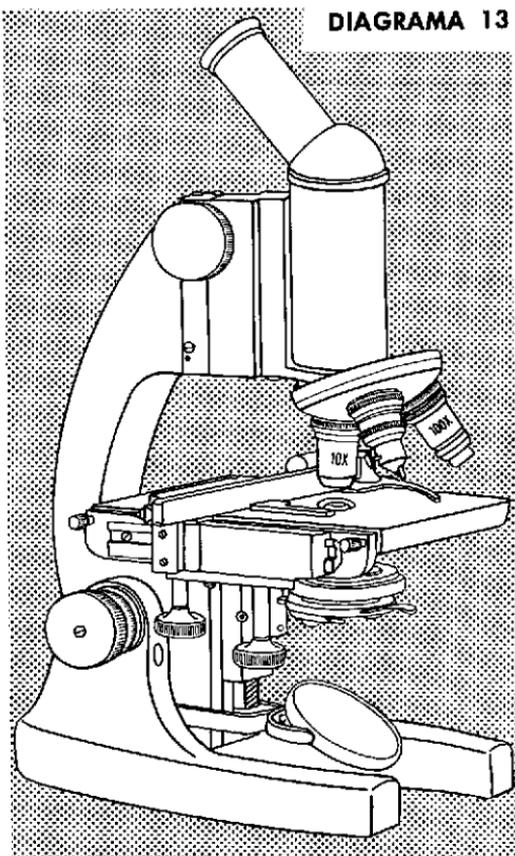
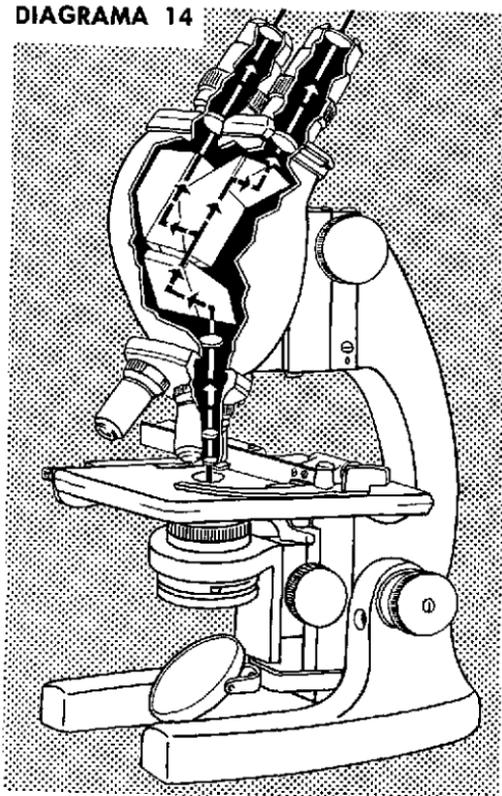


DIAGRAMA 14



cansancio que con un monocular. En el mismo diagrama se observará que, para traer la misma imagen a ambos ojos, se necesita una cantidad considerable de equipo óptico adicional. Cabe señalar que no sólo la luz total que va al portaobjetos a través del espejo y del condensador, queda dividida en dos haces en el tubo del microscopio, sino que, además cada lente o prisma, en el sistema binocular, reduce la cantidad de luz que llega al ojo. Por lo tanto, es evidente que la luz que permite obtener resultados satisfactorios con el microscopio monocular, puede resultar totalmente inadecuada para el binocular.

Por otra parte, mientras que un movimiento del tornillo micrométrico es suficiente para conseguir la resolución máxima en la lente monocular, antes de utilizar el instrumento binocular

se debe practicar un centrado del tubo ocular ajustable que corresponda al poder resolutivo del ocular en el tubo fijo. Cuando estos ajustes se efectúan debidamente, puede obtenerse un grado de resolución que no permitiría un instrumento monocular. Además, se reduce considerablemente la fatiga ocular. El uso del microscopio binocular se complica por el mayor peso del tubo, que al cabo de algún tiempo tiende a deslizarse y a quedar desenfocado.

Algunos cuerpos binoculares, frecuentemente de fabricación europea, debido a su complejo sistema de lentes prismáticos, pueden aumentar la amplificación de la imagen y, por consiguiente, llevan las indicaciones de 1,25x, 1,5x, y 1,6x y hasta 2,5x. Si no están así indicados, ha de considerarse que el aumento de la amplificación es de 1x.

En cuanto a las demás características del microscopio compuesto,

no existe diferencia alguna entre los cuerpos monoculares y binoculares. Cada uno tiene un portaobjetivo giratorio con 3 ó 4 aberturas en las que se insertan los objetivos. La platina debe tener, encima o incorporado a ella, un aditamento que sujete los portaobjetos (carro mecánico) que pueda moverse mecánicamente y con precisión hacia atrás, hacia adelante y de un lado a otro. Puesto que, prácticamente todos los trabajos sobre la malaria son de investigación metódica, no se puede tener la seguridad de no haber inspeccionado repetidamente los mismos campos, *a menos que se utilice un carro mecánico.*

A través de la abertura de la platina, se puede ver la superficie más alta de la lente superior del condensador Abbé, la cual, cuando se encuentra centrada debe estar lo más cerca posible de la superficie inferior del portaobjetos. La función del condensador consiste en concentrar al máximo, en la superficie superior del portaobjetos, toda la luz reflejada por el espejo plano a través de la lente principal del condensador. El espejo que se mantiene fijo directamente debajo del condensador se utiliza para reflejar haces de luz, relativamente paralelos, desde la fuente de la luz al condensador. Para obtener el máximo efecto del condensador, *se emplea solamente el espejo plano;* el cóncavo se utiliza únicamente para aquellas operaciones en que se quita el condensador. Las partes del microscopio situadas debajo del portaobjetos se relacionan con la iluminación y las de la parte superior con las que corresponden al aumento de amplificación y a la resolución de imágenes.

El aumento total que se obtiene en el microscopio compuesto cuando se usa el objetivo de inmersión en aceite (por lo general de 90x a 100x) puede variar de 450x a 1.500x según las lentes (u oculares) de que se disponga. La experiencia demuestra que el aumento en la amplificación del ocular, cuando excede de un punto óptimo, disminuye la claridad del detalle, es decir la *resolución* óptica obtenida.

En general, los objetivos que tienen la mayoría de los microscopios son de baja potencia, o 10x; de alta potencia, o 43x; y de inmersión en aceite, generalmente de 100x, como ya se ha señalado. Los de baja potencia se pueden utilizar convenientemente con el fin de inspeccionar la preparación de sangre para su colocación en el portaobjetos, el aspecto general, la coloración, así como la distribución de leucocitos. El objetivo de 43x resulta de poca utilidad en los trabajos malariológicos y se puede eliminar. En su lugar se puede colocar en el portaobjetivo giratorio un indicador, a fin de

marcar con un círculo los objetos interesantes para nuevo examen. El aumento total se determina combinando los correspondientes aumentos de los elementos ópticos de que se trata, es decir, el ocular, el objetivo y el del tubo, si existiera. Los técnicos en período de adiestramiento apreciarían más detalles con un *aumento intermedio entre 600x y 800x*. Una vez que hayan adquirido experiencia, tal vez observen que con un aumento de 500x realizan su trabajo con mayor rapidez, lo cual se debe, por lo general, a que el incremento en la cantidad de luz compensa ampliamente la pérdida de detalles por la disminución en tamaño. Se pueden utilizar oculares de 5x con aumentos del tubo superiores a 1x. Hay también aumentos del ocular de 4,3x, 6x, 6,3x, 6,4x, 7x, 7,5x, 8x, y 10x. Este último resulta demasiado grande para el uso ordinario con el objetivo de inmersión en aceite.

En los últimos años se han venido tratando todas las superficies de las lentes y prismas expuestos al aire con un "revestimiento"¹ que compensa la desigualdad de la longitud de onda de los colores del espectro y permite una importante reducción en la difusión de la luz. De este modo, las lentes y los prismas así tratados pueden funcionar adecuadamente con mucho menos luz que los que no han sido revestidos. Vistas con luz incidental, las superficies revestidas se pueden distinguir por la presencia de un color violeta azulado. Este tratamiento se utiliza cada vez más en muchos microscopios modernos (véase la Sección 12, Iluminación).

En los climas cálidos y húmedos, es indispensable conservar los microscopios, durante la noche, en un armario o alacena provista de bombillas u otro medio de calefacción, a fin de mantener la temperatura entre 29° y 35°C. Si se deja bajar la temperatura más allá de este límite, aunque sea superior a la temperatura ambiente, puede facilitar el crecimiento de hongos. Por lo tanto, este sencillo procedimiento de almacenamiento impedirá el desarrollo de micelios fungosos en la superficie de las lentes y los prismas. Es preferible que los microscopios que se usan diariamente no se guarden en sus respectivas cajas. Comúnmente se deposita polvo de madera en los prismas y partes superiores de los objetivos de inmersión en aceite, lo que perjudica la resolución. Este polvo puede eliminarse a menudo con el aire expelido por una jeringuilla ordinaria de 4 onzas, para los oídos.²

¹ Película contra la reflexión.

² Véase el Apéndice 19, pág. 120.

Algunas veces, cuando el binocular se enfría considerablemente durante la noche, por debajo de la temperatura del cuerpo humano, o cuando el instrumento ha estado fuera de uso, la resolución, aunque buena al principio, puede de pronto volverse confusa. Cuando el calor de la cara del examinador calienta el aire alrededor de los prismas del binocular, puede formarse humedad rápidamente sobre las superficies frías, la que desaparece tan pronto como las temperaturas del aire y la superficie se igualan.

Un inconveniente que hay con los oculares inclinados, en el trópico y en otros lugares, es que las pestañas se llenan de sudor y la grasa de éste pasa a la parte superior del ocular. Si se lava la cara frecuentemente con agua y jabón se reducirá este inconveniente. Es preciso usar a menudo pedazos de "Kleenex" para limpiar la superficie expuesta del ocular.

12. ILUMINACION

Los objetos microscópicos en las láminas portaobjetos se buscan y examinan con luz reflejada por el espejo del microscopio, a través del condensador. Esta luz atraviesa la preparación y llega a los oculares y éstos convierten los rayos luminosos en una imagen que puede ser identificada. Esa luz se llama luz "transmitida", mientras que la luz que permite el reconocimiento de bandas blancas en los palpos de un mosquito, con el microscopio simple (estereoscópico), es luz "incidente". Los pigmentos sólidos de varios colores del espectro aparecen en esos mismos colores contra la luz incidente; pero con luz transmitida, siendo sólidos, obstruyen el paso de luz y se ven grises o negros.

La luz "blanca" está constituida por todos los colores del espectro y puede ser demostrada con un prisma. Cada color tiene distinta longitud de onda. Cuando la luz blanca encuentra a su paso una superficie de vidrio, cierta porción de rayos es reflejada por la superficie lisa, pero no es reflejada como luz blanca; cada color es reflejado en ángulo distinto, de acuerdo con su longitud de onda específica. El efecto puede ser comparado con una capa de finas burbujas o espuma en una superficie de agua a través de la cual se desearía ver. La luz que pasa a través del agua es obstruida por esta espuma y se necesita mucho más luz para observar lo que está bajo la superficie, que si no existieran las burbujas. El revestimiento

de lentes con una capa contra la reflexión reduce al mínimo la confusa reflexión de distintas longitudes de onda y permite trabajar con una fuente luminosa menor que la que se requiere con lentes no revestidas y con mayor cantidad de luz. Con el tiempo también se puede ahorrar electricidad mediante el empleo de lentes revestidas, incluso aunque esto suponga gastos extraordinarios al principio.

Los microscopios binoculares con sus prismas y, a menudo, con lentes adicionales, requieren una gran cantidad de luz en comparación con el microscopio monocular. La luz total obtenida se divide entre los dos oculares. Para el microscopio binocular se requiere cuando menos el doble de luz que para el monocular; por lo tanto, el sistema de revestimiento en el cuerpo del binocular es una ventaja indiscutible.

Quizá ningún otro aspecto de la medicina requiera tan alto grado de microscopía como el que exige el reconocimiento de los pequeños parásitos de la malaria que puedan encontrarse en una gota gruesa de sangre deshemoglobinizada; generalmente las bacterias pequeñísimas y otros organismos se tiñen solamente de un color y fácilmente se distinguen por contraste en un fondo de otro color. Para el diagnóstico de la malaria es obligatorio que el fondo sea lo más claro y blanco posible, a fin de que se destaquen los objetos más pequeños (de 0,5 a 2 micras de diámetro) coloreados de rojo y azul.

En comparación, el frotis, con una sola capa de glóbulos rojos esparcidos en la superficie de la lámina—de aspecto mayor que el normal, por haber sido extendidos en una superficie muy lisa—puede examinarse con luz mínima y permite reconocer los detalles fácilmente. Por esta razón, *nunca debe usarse un extendido para valorar* lo adecuado de la luz y la calidad de la imagen. Para conseguir este propósito particular debe tenerse a mano una gota gruesa bien preparada y bien coloreada.

Además el campo microscópico, esto es, el campo microscópico de inmersión en aceite, debe iluminarse uniformemente con luz blanca azulada en todo momento. El microscopio, la lámpara y los filtros deben disponerse de modo que se pueda obtener la mayor cantidad posible de luz. Logrado esto, la luz se puede reducir, por medio del diafragma iris del condensador, en el grado que desee cada microscopista.

En un tiempo se pensó que sólo la luz del día era la ideal para el microscopio de entonces, es decir el monocular; los antiguos observadores se colocaban cerca de una ventana orientada hacia el norte y

el espejo se instalaba de manera que reflejara la luz de las nubes blancas. Empleada en esa forma, la luz del día, a pesar de que es inconstante, puede seguir considerándose como una buena fuente de iluminación para el microscopio monocular. Para el binocular, solamente la electricidad provee una fuente constante de luz uniforme; sin embargo, cuando se usa la electricidad conviene tener en cuenta un factor importante: la marcada coloración amarillenta que tiene frecuentemente.

Hay muchos tipos especiales de lámparas para microscopio que son excelentes para los trabajos malariológicos, así como hay otras que no satisfacen las necesidades de las mismas. Es preciso reconocer que muchas lámparas de alta calidad han sido diseñadas específicamente para microfotografía, y esas lámparas no se necesitan en los programas de erradicación de la malaria. Para ellos resulta plenamente adecuado el empleo de aparatos más sencillos.

Por lo tanto, no hay ni que pensar en fuentes de iluminación que dependan del uso de tipos especiales de focos; en cambio, deben considerarse aquellas en las que se puedan usar lámparas obtenibles en el mercado local. En el caso de lámparas con enchufes especiales, éstos deben cambiarse siempre que sea posible. No deben comprarse fuentes de iluminación incorporadas al propio microscopio, sino que se deben pedir los espejos usuales.

Como no se puede utilizar luz directa del sol para los microscopios debido al resplandor, tampoco es posible usar focos de vidrio transparente. Si los focos son transparentes, es necesario utilizar un filtro de vidrio esmerilado, incorporado a la lámpara o situado directamente debajo del condensador del microscopio. Cuando se usan fuentes de luz de poca intensidad, es preferible usar un filtro delgado de esmeril fino, y, por el contrario, cuando se utilice una fuente luminosa más intensa, el filtro deberá ser más grueso. Frecuentemente el grado de esmerilado del filtro suministrado junto con la lámpara es tan grueso, que impide considerablemente el paso de luz de tal manera que la que llega al microscopio resulta insuficiente. A menudo, también se combina el filtro de vidrio esmerilado con un filtro azul y los dos juntos reducen la luz a un nivel inferior al necesario para el trabajo.

Es imperativo usar algún tipo de filtro azul con el objeto de obtener un fondo azul-blanco necesario para la observación completa de leucocitos, parásitos y plaquetas. Con frecuencia, los círculos de vidrio azul usados bajo el filtro son demasiado azules para la fuente de luz, o bien cuando se usan en combinación con el filtro de vidrio

esmerilado se reduce la luz excesivamente.

Los focos de 110 voltios dan un calor proporcional al número de vatios, de aquí la necesidad de transformadores y lámparas especiales de bajo voltaje. Sin embargo, el calor de los focos de 100 vatios o menos puede tolerarse con una ventilación apropiada. No pueden usarse bombillas descubiertas o sin protección porque el resplandor deslumbra al operador o a los que se encuentran a su alrededor.

La explicación anterior se refiere sólo al uso del objetivo de inmersión en aceite, pues muchas fuentes de iluminación son satisfactorias para observaciones anatomopatológicas y exámenes de materias fecales, de orina, etc., pero no producen suficiente luz para observar los parásitos de la malaria.

Un ejemplo de iluminación adecuada para *microscopios monoculares* es la bombilla azul ordinaria de 60 vatios, esmerilada, de las llamadas "luz del día". Si el voltaje es bueno, es preferible la de 40 vatios. Esta bombilla, colocada en una base de porcelana y convenientemente oculta por tres lados, da una cantidad adecuada de luz azul-blanca, sin que se requiera filtro alguno.

Se necesitan aproximadamente 150 vatios para un microscopio binocular de uso común; pero como el color azul y el grado de esmerilado es el mismo que el de un foco de 60 vatios, el azul resulta insuficiente para tanta luz y entonces se requiere otro filtro azul. Cualquier lámpara de 150 vatios da una luz que produce un calor excesivo para que resulte práctica. Una lámpara en la que se usa una serie de filtros generalmente tiene una bombilla transparente especial como fuente luminosa y no debe ser usada. El modelo A.H.T. Cat. N° 6958, antiguo diseño alemán para observación en campo oscuro, da excelentes resultados en este aspecto. Para la labor de erradicación de la malaria no se necesita el foco transparente de 200 vatios ni el soporte interno ajustable; en cambio, el modelo N° 6958-E con un foco esmerilado de 100 vatios da resultados satisfactorios. Una bombilla esmerilada corriente de 100 vatios, colocada detrás de un matraz de 250-300 cc, es muy adecuada si el agua que contiene dicho matraz se tiñe ligeramente de azul. Para lograr esto, se agrega al agua del matraz un número suficiente de gotas de una solución de "luz de día artificial" (9 cc de solución de sulfato cúprico al 20% + 1 cc de anilina azul al 0,6 por ciento). El exceso de azul es peor que el azul insuficiente porque reduce considerablemente la luz. Esta solución se cambia conforme sea necesario. Si no hay mucha turbiedad, a menudo basta agregar unas pocas gotas de ácido acético concentrado o amoníaco para

hacerla desaparecer.

La fuente luminosa debe estar rodeada de algún material opaco, excepto donde brilla sobre el espejo del microscopio. El iluminador de tipo "Chalet" (American Optical N° 361 *sin* vidrio esmerilado o azul, \$16,00) puede controlar el resplandor y aguantar el foco de 60 ó 100 vatios suspendido en la parte de arriba. El matraz azul se coloca sobre bloques en una posición apropiada entre la lámpara y el espejo.

Las instalaciones anteriormente descritas pueden ser fácilmente improvisadas usando cartón oscuro (papel aislante), una base o un portalámparas de porcelana y unos 3 metros de alambre. Como se observa en el Diagrama 15, la posición de la zona más brillante del foco, el centro del matraz esférico, que actúa como lente, y el espejo, colocados a las alturas convenientes cada uno en relación con el otro, tiene la mayor importancia si se desean obtener resultados óptimos. Se pueden usar algunos bloques de madera de 1 a 2 cm de grueso, para que el foco y el matraz estén a la altura apropiada.

Un fotómetro electrónico que marque el número de bujías/pies que alcanza al ojo, es muy útil para ayudar al estudiante a obtener el máximo de luz. Una pieza de equipo muy valiosa para enseñar cuál es la iluminación apropiada de un microscopio y para demostrar con exactitud qué cantidad de luz realmente llega al ojo, es el fotómetro "Photovolt" (véase el Apéndice 21, pág. 122).

Los mismos principios que se demuestran en el Diagrama 15 pueden ser aplicados a una lámpara improvisada como la que se representa a la izquierda del Diagrama 16, en el que se muestra un dibujo a escala de esta lámpara, la cual se une por medio de sujetapapeles de bronce. Cuando dos trabajadores se sientan uno frente al otro se usan dos aberturas.

Los focos esmerilados de 100 vatios varían considerablemente, no sólo en forma y tamaño (especialmente en longitud), sino también en cuanto a la cantidad de luz que dan y el grado de deterioro al ser usados. Algunos de calidad inferior oscurecen de tal manera el interior del esmerilado que llegan a producir una pérdida de 30 por ciento. Cuando el voltaje de la línea es más bajo que el especificado en el foco, en 10 o más voltios, puede ser necesario obtener un regulador de voltaje de línea a fin de lograr el máximo de luz.

El daltonismo afecta la labor del microscopista. Sería conveniente someter a los candidatos a una de las pruebas de la visión para los colores; a tal efecto son excelentes las placas pseudoisocromáticas H-R-R de la American Optical Company.

DIAGRAMA 15

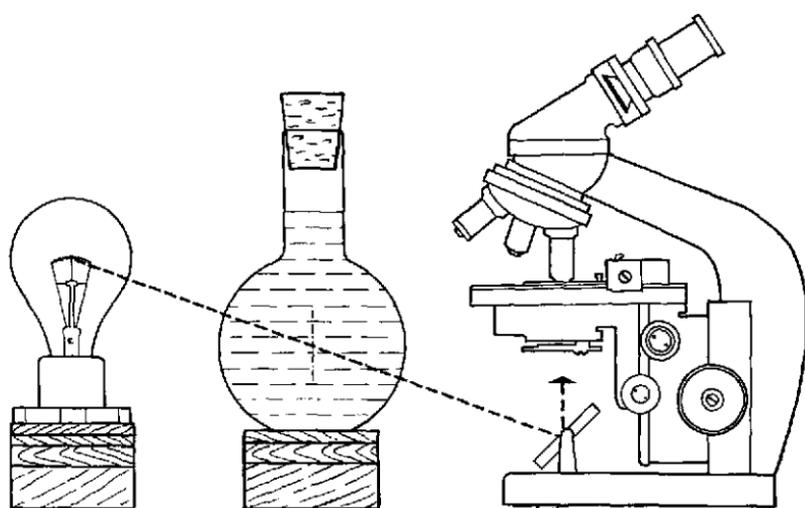
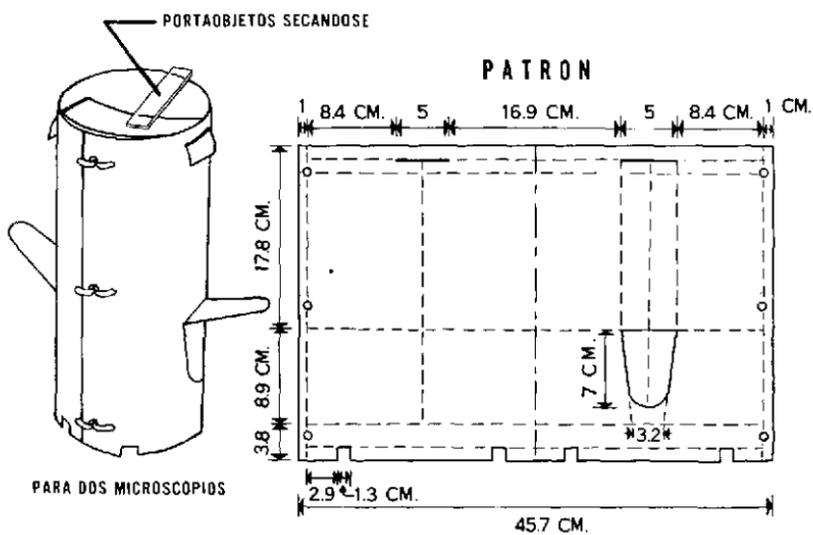


DIAGRAMA 16



13. TECNICA DEL EXAMEN MICROSCOPICO

Para evitar errores y pérdida de tiempo, es preciso que, antes de intentar la búsqueda de parásitos, el microscopista sepa ejecutar debidamente las siguientes operaciones, que quizá parezcan insignificantes:

1. Colocar una pequeña gota de aceite de inmersión cerca del borde de la gota gruesa de sangre.

2. Comprobar y registrar en la hoja de trabajo la identificación de la lámina, así como cualquier manifestación poco corriente que pueda presentarse.

3. Situar el portaobjetos en posición entre las agarraderas del carro mecánico del microscopio y cerciorarse de que esté firmemente colocado sobre la barra móvil del carro. Si no se procede en esta forma, posiblemente se extravíen los objetos dudosos o sospechosos antes de que puedan localizarse de manera permanente mediante un círculo hecho con un marcador adecuado.¹

4. Examinar brevemente la gota gruesa con el objetivo de 10x hasta encontrar un área conveniente donde los leucocitos sean numerosos y estén manifestamente bien coloreados. Si resulta difícil localizar un área que reúna esas condiciones, se ha de extender una delgada capa de aceite sobre toda el área coloreada, y proceder sistemáticamente a un nuevo examen con el objetivo de 10x.

5. Cuando se ha encontrado un área conveniente, colocar otra gota de aceite en el área iluminada. Girar el objetivo de 100x hasta lograr la posición deseada. Inclinando la cabeza bien hacia un lado, y usando el tornillo macrométrico, bajar el objetivo al aceite hasta que la punta apenas toque el cristal.

6. Fijar la vista en la apertura del ocular y continuar levantando el cuerpo del microscopio con el *tornillo macrométrico* hasta que se perciban los leucocitos. Traer al centro del campo y lograr un enfoque óptimo, con el *tornillo micrométrico*, un leucocito polimorfonuclear bien coloreado, de preferencia uno junto al cual haya algunas plaquetas. Hacer girar el tornillo micrométrico para atrás y para adelante, casi con violencia y rápidamente, a través de 50 divisiones sobre el eje mientras se enfoca el campo. Si, durante estos movimientos, los leucocitos parecen moverse radialmente, incluso ligeramente, en cualquier dirección, *detener* y ajustar el espejo o su peso, o la distancia de la fuente luminosa, hasta que los leucoci-

¹ Véase el Apéndice 16, pág. 115.

tos den la impresión de desplazarse sobre el mismo lugar como consecuencia de un movimiento amplio.

Las áreas libres o el campo entre los leucocitos deben ser de color blanco, con un ligero tinte azul. Es probable que la luz sea menos amarilla y más abundante que antes de efectuarse los ajustes. De no ser así, hay que proseguir las alteraciones hasta lograr la iluminación máxima.

7. Seguidamente, limpiar bien los oculares en su parte superior con un pedazo pequeño de papel fino tipo "Kleenex". El polvo de la parte *externa* de las lentes inferiores de los oculares debe quitarse con el aire producido por una jeringuilla. En la parte interior de la lente inferior el polvo se acumula con más lentitud. Luego, ajustar los oculares a la distancia interpupilar exacta, previamente determinada de la escala, por ejemplo 68. El tubo ocular único ajustable se mueve de arriba hacia abajo hasta que la resolución sea igual en cada ojo.

8. Examinar los elementos de la sangre normal descritos en la Sección 3, págs. 11-14. Anotar cualquier desviación del color habitual y cualquier manifestación que se presente.

9. Únicamente cuando los elementos normales de la sangre aparecen en sus propios colores, cabe esperar que cualesquier parásitos presentes aparezcan en sus colores apropiados. Por lo tanto, si el núcleo de los leucocitos es demasiado rojo en algún área del portaobjetos, es poco probable que se observe el color azul en el citoplasma de los parásitos. Ahora bien, si los leucocitos son demasiado azules, es poco probable que las partículas de cromatina tengan mucho color rojo. No debe desconocerse, sin embargo, que en algunas ocasiones, cuando la coloración de los elementos celulares es pálida o deficiente, los parásitos pueden continuar destacándose en forma clara y exacta por varias semanas.

10. Adquirir pericia para reconocer el aspecto y el color del pigmento de la malaria a la mayor brevedad posible, para evitar que muchos cuerpos sospechosos, hasta del tamaño de un linfocito pequeño o más grande, puedan descartarse de inmediato por no considerárseles parásitos si no se reconoce la presencia de pigmento en ellos.

11. Durante todas estas operaciones, observar sistemáticamente si las células y otros elementos examinados para determinar su color se perciben también como imágenes completas, buenas y claras, es decir si la resolución fluctúa entre excelente y buena. Si esto no sucede, la causa debe ser remediada antes de continuar el examen.

Una vez que se han aprendido a fondo estas operaciones, se puede examinar el frotis. Como habitualmente se busca un mínimo de 100 campos en la gota gruesa de sangre antes de determinar la negatividad de la sangre, sería conveniente saber exactamente qué es lo que constituye un campo microscópico práctico.

Debido a que hay pocos campos microscópicos que son totalmente planos con el objetivo de inmersión en aceite, toma mucho tiempo tratar de examinar en detalle cada uno de los elementos del área iluminada. Todo elemento que requiera examen cuidadoso, se debe situar en el centro del campo donde la nitidez es la máxima. Por lo tanto, *para la búsqueda de parásitos*, el campo microscópico puede definirse como la parte del área iluminada que se encuentra en un foco tan claro como algo localizado exactamente en el centro. Algunas veces, esto puede incluir a lo sumo dos tercios del área iluminada.

Una vez que se reconoce la utilidad de determinar el centro exacto del campo, se puede trasladar allí cualquier elemento, sometido a estudio, de modo que son superfluas las líneas cruzadas o indicadores del ocular.

Comenzando en un borde de la gota gruesa, el portaobjetos se mueve en forma de zig-zag debajo del objetivo, con la máxima rapidez compatible con la visualización de esta área central, y cada vez que se examina una nueva área de las mismas dimensiones, se considera que constituye un campo microscópico.

Para compensar las diferencias entre los observadores, el examen de una muestra no se debe medir por la cantidad de minutos invertidos, sino por el número de campos observados. El número de campos observados por principiantes bajo supervisión ha variado de 39 a 215, durante el mismo período de observación. Una gota gruesa de sangre, aproximadamente de 3 a 4 cm², puede contener de 500 a 800 campos microscópicos. Es evidente que sólo en circunstancias muy especiales, como en las pruebas de infecciones y ensayos de drogas, puede hacerse el examen de toda la preparación. En los casos en que los síntomas en un paciente febril son producidos por la malaria, por lo general los parásitos se encuentran fácilmente, es decir, hay varios en cada campo. Cuando son escasos se puede anotar la proporción correspondiente a 100 campos microscópicos, por ejemplo, 37/100, o simplemente 37 V (en el caso de *vivax*).

Si el observador ha estado examinando portaobjetos con preparaciones similares casi diariamente, la identificación de la cromatina

será automática. Ahora bien, si no se ha usado el microscopio durante algunos días, es conveniente encontrar algunos parásitos comprobados, a fin de orientarse en cuanto a la densidad específica y característica que uniformemente presenta la cromatina. Cuando en una preparación aparezca un solo parásito, hay que proceder con cautela en el diagnóstico; hay que encontrar por lo menos tres parásitos. Ya no se buscan formas específicas del parásito, sino más bien se examinan tantos parásitos definidos como sea posible observar, para determinar el tamaño del mayor, el del menor y el de la mayoría (Véase el Apéndice 4, pág. 101). Se sugiere que una buena lámina positiva se examine por lo menos en 50 campos, a fin de que no pase desapercibida la evidencia de una infección secundaria.

Si se desea investigar cualquier aspecto *poco corriente* del parásito en la gota gruesa de sangre, siempre que se cuente con el paciente, se puede tomar un frotis o extendido y proceder a su examen con la esperanza de encontrar formas que puedan explicar una apariencia poco frecuente, por ejemplo, las formas de rosca, de esquizontos y pre-esquizontos de *P. vivax* y *P. malariae*. Resultaría poco prudente tratar de diagnosticar las especies en el extendido con sólo dos o tres parásitos.

14. REGISTRO Y NOTIFICACION DE LOS RESULTADOS

En los servicios dedicados a la erradicación de la malaria, puede constituir una pérdida de tiempo escribir *Plasmodium*, *Plas.*, o *P.* cada vez que se hace referencia a alguna de las especies. Los símbolos o las abreviaturas convenientes ocupan menos espacio y economizan trabajo, por ejemplo; F, Fg, V, M.

Si estos símbolos se combinan con el uso inteligente de números aproximados, distribuidos bajo cuatro títulos únicamente, se podrá registrar la situación exacta con respecto a los resultados de los exámenes de muestras de sangre.

Por lo tanto, se recomienda que se suprima la abreviatura *P.* y la palabra "positiva" que por sí misma no significa gran cosa. La palabra "negativa" se ha aceptado actualmente para denotar que no se han encontrado parásitos en 100 campos de una gota gruesa de sangre. Cuando en el formulario de informe haya espacio para anotar el número total de láminas examinadas y las positivas se

registren mediante una referencia numérica, no es necesario escribir "neg." después de cada negativa. Basta un punto o una marca para indicar que la lámina ha sido examinada.

La infección por *falciparum* se divide en las tres fases siguientes:

- | | |
|---------------------------|---------|
| 1. Anillos únicamente | = F |
| 2. Anillos y gametocitos | = F + g |
| 3. Gametocitos únicamente | = Fg |

No se requieren otras explicaciones.

Ahora bien, no es necesario hacer mención especial de los gametocitos de las otras tres especies, excepto para recordar al observador que pueden persistir durante varios ciclos y que posiblemente se encuentren algunos viejos y descoloreados. A diferencia del *falciparum*, no se requiere una droga especial para eliminarlos de la circulación. Todas las diferentes formas del ciclo de desarrollo pueden verse en la circulación periférica en algún momento durante las 48 a 72 horas necesarias para completar el ciclo, pero desaparecen después de ingerir una droga esquizontocida.

La V es la única anotación que se requiere para todas las formas de *vivax*; la M para todas las formas de *malariae*; y Ov para *ovale* (cuya existencia no se ha demostrado todavía en el Hemisferio Occidental).

Lo importante es dar alguna indicación del número de parásitos presentes. No es que las cifras elevadas puedan interpretarse en el sentido de que revelan infecciones nuevas o recientes y que las bajas denotan infecciones antiguas, sino únicamente que son mayores las probabilidades de lograr un diagnóstico correcto de las especies cuando se trata de cifras elevadas que cuando éstas son muy bajas. La revisión de la lámina reviste importancia en el caso de un escaso número de parásitos.

Los números pueden registrarse de un modo general como sigue (los valores numéricos asignados a ++ y +++ son simplemente aproximaciones):

Cuando el promedio de parásitos es de 1 por campo = +
 2-20 por campo = ++
 21-200 por campo = +++
 más de 200 por campo = ++++

Cuando el número de parásitos contados en 100
 campos fluctúa entre 40 y 60 = $\frac{+}{2}$

Cualquier número inferior a 40 por 100 campos debe escribirse completamente, por ejemplo: 33.

Cuando se distribuyen solamente en cuatro columnas, estas aproximaciones o cifras efectivas pueden usarse para el diagnóstico exacto de cualquier combinación posible de especies, a saber:

F	F _G	V	M
++	14	•	•
•	•	+++	•
•	37	++	•
•	29	•	++
•	•	$\frac{+}{2}$	9

Tres parásitos por 100 campos es el mayor número permisible de parásitos que un segundo microscopista puede encontrar ulteriormente en una lámina que ya se ha declarado "negativa". Esto puede considerarse como una línea de base para determinar los errores. Si no se encuentran más de tres parásitos, se devuelve al microscopista una simple notificación con el resultado original, en lugar del formulario que indica "error de diagnóstico" y que se envía cuando éste ha sido defectuoso.

15. PROCEDIMIENTOS GENERALES SUGERIDOS PARA EL EXAMEN ORDENADO DE LAMINAS COLOREADAS

1. Ajústese la silla a la altura conveniente para el examinador.
2. Quítese todo rastro de huellas digitales, polvo o aceite de todo el microscopio con un trapo suave o papel fino tipo "Kleenex". Cerciórese de que el carro del microscopio se mueve libremente en ambas direcciones. En caso contrario, desmóntese y límpiase la parte inferior de la platina y la plataforma. NO LUBRIFIQUE. Use vaselina en todas las superficies secas movibles.
3. Compruébese en el matraz la solución, que debe ser transparente y no demasiado azul.

4. Cierre un poco el diafragma iris a fin de poder usar el objetivo 10x; ábrase siempre cuando se enfoca el objetivo 100x.
5. Utilícese la mano izquierda para enfocar constantemente el tornillo micrométrico, y la derecha para cambiar los campos con los controles del carro del microscopio. El enfoque constante es *condición indispensable* en el caso de gotas gruesas de sangre.
6. Examínense de nuevo las características de la sangre (véase la pág. 11), con objeto de facilitar la evaluación de la calidad de la coloración y el reconocimiento de parásitos si los hay.
7. Al terminar el examen de cada lámina, quítese todo rastro de aceite y de lápiz grasoso, si se ha utilizado, limpiando suavemente con papel fino humedecido con tolueno. En el caso de un gran número de láminas, es preferible usar una botella de boca ancha, de 60 ml de capacidad, llena de tolueno. Primero, quítese el exceso de aceite del portaobjetos con papel tipo "Kleenex"; sumérjase la lámina en la botella de tolueno; luego límpiase ligeramente con un pedazo de papel tipo "Kleenex", seco.
8. Al final del período de trabajo, sáquese el último portaobjetos y haga girar el objetivo 10x hasta colocarlo directamente sobre el condensador. Haga descender este objetivo hasta que llegue al seguro automático. Quítese el aceite del objetivo 100x.
9. Colóquese nuevamente el carro en una posición central.
10. Cúbrase el instrumento con una cubierta para protegerlo del polvo y devuélvase al lugar enumerado en el armario con calefacción.

16. PORTAOBJETOS

Estos objetos son tan corrientes y conocidos que la mayoría de la gente cree que se trata de unas piezas de cristal de longitud, anchura, grosor y calidad estándar. Sin embargo, esto no es así. Los portaobjetos de diferentes fabricantes y diversos países varían ligeramente en grosor,¹ longitud y anchura.² Antes de formular

¹ 0,8-1,3 mm. Para obtener el grosor medio, mídanse 10 portaobjetos.

² 77 x 27, 76 x 26, 76 x 25, **75 x 25** y 74 x 24 mm.

un pedido de portaobjetos para microscopio, hay que tener en cuenta la manipulación a que han de ser sometidos. Se habrán de lavar y secar frotándolos con fuerza; tendrán que enviarse a lugares distantes, en diversas condiciones, y se tendrán que almacenar y distribuir. Es muy posible que antes de que se depositen sobre ellos las muestras de sangre, hayan tenido que ser transportados a grandes distancias en jeep, a caballo, en barco o a pie. Luego los portaobjetos llevarán muestras de sangre cuya obtención puede costar desde unos centavos hasta muchos pesos. Y pasarán por muchas manos antes de que la muestra sea finalmente examinada, verificada y, por último, almacenada para futura referencia. Los portaobjetos han de tener suficiente resistencia para soportar todas esas operaciones. Si se tienen en cuenta todos estos puntos, no será probable que se dé más importancia a la economía que a las ventajas que ofrece un portaobjetos de buena calidad.

Si sólo se dispone de portaobjetos ya usados, en gran cantidad, se deben examinar uno por uno. Se deben descartar aquellos que presenten aunque sólo sea un principio de corrosión y separar los restantes en grupos de idéntico color, grosor, longitud y anchura. Hecho esto, se deben lavar y empacar en grupos, de conformidad con las normas contenidas en las instrucciones que figuran a continuación.

Entre los mejores portaobjetos para microscopio de que se dispone figuran los Micro, Red Label, Special A.H.T. N° 7030, no corrosivos. Son éstos muy uniformes y fuertes y de un grosor de 1,10 a 1,30 mm, con bordes pulidos y esquinas ligeramente redondeadas; el borde largo está ligeramente biselado, lo que reduce considerablemente el riesgo de cortes en los dedos durante la limpieza. El precio de catálogo es de \$3,35 por gruesa. Los portaobjetos "clínicos" N° 7030-C son idénticos, pero no tienen el biselado. Su precio de catálogo es de \$1,90-\$2,85 por gruesa.

Se pueden obtener en el mercado varias marcas de portaobjetos denominados "pre-cleaned" (pre-limpios). Se podrían ensayar si se ajustan a las mencionadas condiciones, y demuestran que están suficientemente limpios con la coloración de Giemsa y no contienen grasa alguna. Tal vez podrían frotarse con alcohol de 90% y de esta manera, utilizarse, aunque resultan caros.

El portaobjetos denominado de "seguridad" (*safety-grip*), de bordes irregulares, es también delgado y de menos de 1 mm de grosor; pero es dudoso que quede tan perfectamente limpio como el de bordes pulidos.

Los portaobjetos nuevos, que no hayan sido usados, pero que hayan permanecido almacenados durante meses, en condiciones favorables, pueden presentar diferentes grados de corrosión. De ser posible, no se deben utilizar para exámenes de sangre, sino más bien darles otro uso.

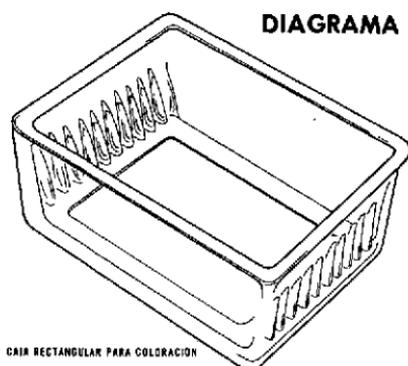
Los portaobjetos nuevos se reciben generalmente en cajas de cartón, en las que sobra todavía un pequeño espacio después de haber colocado en ellas 72 portaobjetos. Si se llena ese espacio con un número adecuado de portaobjetos limpios, generalmente de 3 a 8, el paquete queda en buenas condiciones para el embarque o almacenamiento. Para envío por correo, es conveniente reforzar las cajas con cartón acanalado y envolverlas en papel fuerte. Todas las cajas de cartón de esta clase se deben conservar para tal uso.

Limpieza de los portaobjetos de microscopio

La coloración de los parásitos de la malaria y otros que se encuentran en la sangre, es en realidad, una reacción química muy delicada que se altera fácilmente por contacto con ácidos o álcalis muy diluidos, jabones, desinfectantes y materiales absorbentes, tales como suero o sudor secos. Un vestigio de grasa o aceite dificulta la penetración del colorante y es la causa más común de que la sangre se desprenda del portaobjetos en forma de pequeñas escamas.

Por esta razón, no se ha encontrado hasta ahora una forma de simplificar la limpieza de los portaobjetos. No basta con que las superficies estén pulidas, sino que hay que frotarlas fuertemente con un paño limpio hasta que no quede nada adherido al cristal. En realidad, se requiere tanta presión para hacer esto, que los principiantes frecuentemente quiebran muchos portaobjetos cuando están aprendiendo a frotarlos debidamente. Además, una buena limpieza de los portaobjetos reduce el número de partículas extrañas que puedan aparecer en cualquier preparación sanguínea, dando lugar a confusión.

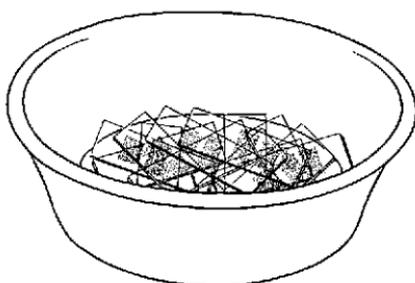
Se halla muy generalizada la idea de que los portaobjetos nuevos, de una caja recién abierta, son los mejores. Pero esto no es cierto en modo alguno, porque los portaobjetos nuevos están frecuentemente contaminados por las materias químicas empleadas durante el proceso de pulimento, y éstas rara vez se eliminan lavando o sumergiendo largo tiempo en agua los portaobjetos, antes de apretarlos unos contra otros, para que despidan el agua sobrante.

DIAGRAMA 17

CAJA RECTANGULAR PARA COLORACION

Es indispensable contar con cajas de coloración que mantengan los portaobjetos separados unos de otros mientras se lavan, sumergen y enjuagan (Diagrama 17). Estas cajas van provistas de una tapa de ajuste flojo y tienen ranuras para colocar los portaobjetos a fin de mantenerlos separados (A.H.T. N° 9194). Cada una de las personas que realicen los trabajos debe disponer de cuatro cajas, como mínimo; una tapa puede servir para cuatro cajas dispuestas una sobre la otra.

Cuando los portaobjetos que hayan de lavarse sean tan numerosos que las cajas de coloración dejen de ser prácticas, deben distribuirse aquéllos en una vasija de tal manera que el agua llegue a la superficie de cada uno (véase el Diagrama 18).

DIAGRAMA 18

Portaobjetos nuevos. Estos se someten a un tratamiento que consiste en colocarlos en bandejas de vidrio, con ranuras, que los mantienen separados unos de otros, y en sumergirlos, por lo menos de 12 a 24 horas, en un líquido para limpiar cristal, que se prepara de la siguiente manera:

Bicromato potásico	60 gm
Acido sulfúrico (concentrado, 95-98%, H_2SO_4)	300 cc
Agua	400 cc

(Agréguese el ácido al agua *muy* lentamente, sosteniendo de preferencia el matraz en agua corriente para que se enfríe.)

El líquido para limpiar cristal debe mantenerse en una botella con tapón de cristal que lleve una etiqueta bien visible que diga "¡PELIGRO!—No tocar con las manos o la ropa".

Una vez utilizada, esta solución se vierte nuevamente en la botella por medio de un embudo ancho. Los portaobjetos se enjuagan en agua corriente sin retirarlos del soporte. Si no se dispone de agua corriente, se cambia el agua varias veces hasta que desaparezca todo vestigio de ácido. Si se dispone de abundante agua destilada, los portaobjetos se enjuagan finalmente en ella antes de secarlos frotándolos firmemente en dirección longitudinal. A continuación, los portaobjetos se colocan, uno por uno, sobre un cartón, una mesa o un banco muy limpios, para que se sequen totalmente las orillas. Recientemente, dos embarques de portaobjetos nuevos tenían una delgada película cerosa que resistió el pase por el ácido de relativamente baja concentración. El ácido más concentrado no tuvo efecto alguno. Después del enjuague, se dejaron durante la noche en una solución detergente que produjo la completa desaparición del revestimiento ceroso. Si dos o tres ensayos empleando únicamente detergente demuestran que los portaobjetos están realmente limpios, puede omitirse la fase de tratamiento con ácido.

Si esta operación de limpieza se hace bien, no habrá necesidad de sumergir los portaobjetos en alcohol de buena calidad para eliminar completamente la grasa. Si se utiliza alcohol, los portaobjetos deberán secarse antes de sumergirlos en él.

Una vez lavados y secos, los portaobjetos se empaquetan, bien apretados, en lotes de 10, 15 ó 20 (si son delgados) y quedan dispuestos para su uso. Es conveniente indicar la fecha en que fueron empacados porque, a veces, antes de usarlos, es necesario volver a lavar aquellos que han permanecido empaquetados varios meses, dependiendo ello de la humedad y la contaminación del aire debido a sustancias tales como los gases de motores

Portaobjetos usados. Después del primer examen, en todos los portaobjetos queda una cantidad mayor o menor de aceite de inmersión. Si se desea conservarlos para otro examen, se puede verter en ellos unas gotas de tolueno de buena calidad y colocarlos en un escurridor de madera para que se sequen. Un procedimiento mejor consiste en sumergirlos en una botella de boca ancha, de 60 cc, llena de tolueno para quitarles cualquier rastro de aceite que no hubiera desaparecido con un ligero frote con papel seco tipo "Kleenex". Después de esta operación, los portaobjetos se envuelven en papel cebolla, de unos 11 x 21 cm, y sobre el envoltorio se anota su identificación con lápiz de plomo. Los portaobjetos coloreados y cubiertos de aceite se deterioran rápidamente si se dejan expuestos a la luz del sol o esparcidos sobre un banco o una mesa.

Para el lavado, se ha de disponer de una vasija de vidrio, de esmalte o plástico (Diagrama 18), que tenga por lo menos 10 cm de profundidad y que se llenará hasta la mitad con una fuerte solución (al 5%) de jabón o detergente (1/2%), en la que se depositarán los portaobjetos que se han de lavar. Cualquiera de los compuestos de limpieza para laboratorio, similares al de A.H.T. N° 3298, reseca menos las manos que los detergentes comerciales de tipo corriente. Los portaobjetos no deben dejarse nunca en remojo en vasijas poco profundas, tales como bandejas o cubetas planas, pues casi siempre se olvidan y la evaporación lenta del agua o de la solución deja, en la superficie del portaobjetos, unas marcas de corrosión que pueden ser permanentes. Los portaobjetos no deberán permanecer nunca en agua sola más de 3 días, pues ésta pueda hacerse viscosa y formarse en la superficie una espuma muy desagradable. Cada 2 a 3 días, los portaobjetos sumergidos en la solución detergente o de jabón deben trasladarse a un recipiente de almacenamiento mayor y más profundo. Si, mientras están húmedos, se pasan entre el dedo pulgar y el índice, la mayor parte de la sangre coloreada y del aceite se quedará en el primer recipiente. Estos portaobjetos pueden colocarse juntos, para su almacenamiento, en una solución débil de detergente, pero para que queden bien limpios se deben separar uno a uno o se han de manipular en las cajas o platillos de coloración mencionados anteriormente.

En esas cajas, los portaobjetos se someten al agua corriente durante media hora o bien se cambia el agua 20 veces. Los portaobjetos nuevos pueden colocarse en agua corriente, frotándolos ligeramente con los dedos, y enjuagándolos durante media hora, también en agua corriente.

Puesto que los portaobjetos usados han sido expuestos al aceite, es con frecuencia más difícil dejarlos libres de grasa. Después de sacarlos del agua y *dejarlos secar completamente*, se colocan en alcohol de 90-95%; se secan de nuevo con un trapo limpio y se empaacan. El alcohol puede utilizarse varias veces si se pasa por un filtro de papel y se vuelve a guardar en la botella.

Observaciones. Parecerá tal vez que todo esto es mucho trabajo, pero su necesidad se comprenderá sólo con ver un grupo de varios portaobjetos preparados por un ayudante descuidado y observar que, después de la coloración, no queda en ellos más que un círculo de sangre de la muestra extraída de una persona que quizás ya se encuentra a 100 kilómetros de distancia.

El método bacteriológico de flamear los portaobjetos antes de utilizarlos no es indispensable y, por otro lado, puede aumentar la fragilidad de éstos y acelerar la corrosión. Tampoco se necesita hervirlos.

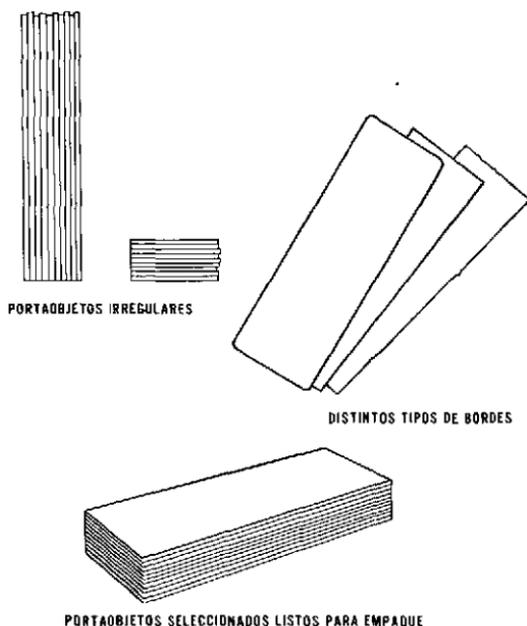
Los portaobjetos limpios se pueden guardar hasta que se necesiten, sumergidos en alcohol de 90-95%, en frascos de boca ancha, de 5 cm de diámetro por 10 cm de altura. Se frota con trapos limpios especiales para vidrio y se empaquetan antes de utilizarlos.

Importancia de la limpieza de las toallas. Para lograr la meticulosa limpieza que se requiere en los objetos de vidrio, conviene disponer de abundantes toallas de un tejido de algodón adecuado y que tengan la menor cantidad posible de pelusas. El material no debe ser ni muy grueso ni muy delgado, y se le debe quitar todo el apresto lavándolo repetidas veces. Para confeccionar las toallas se puede emplear una tela del tipo de la llamada "cabeza de indio", cortándola en piezas de 40 x 60 cm, y haciendo los correspondientes dobladillos en los bordes. Las toallas así confeccionadas se han de utilizar solamente para secar la cristalería, y no deben emplearse jamás para las manos o la cara ni para secar la mesa o el fregadero.

Hay que tener en cuenta que estos paños de algodón rara vez se ensucian si se utilizan únicamente para secar vidrio. No obstante, se deben lavar con frecuencia ya que las manos de los individuos que los manipulan están constantemente sudadas en mayor o menor grado según el clima, y los paños absorben el sudor.

Las toallas sucias se remojan en agua y se enjabonan bien con un jabón de buena calidad, o se sumergen en una fuerte solución de

DIAGRAMA 19



detergente y se dejan en remojo por 15 ó 30 minutos o durante toda una noche. Después de removerlas bien y de frotar con fuerza donde haya manchas visibles, se enjuagan varias veces hasta que desaparezca todo vestigio de jabón o detergente. Cuando se dispone de abundante agua destilada, es conveniente utilizarla para un último enjuague. Nunca se deben almidonar las toallas, y si se entregan a lavanderías comerciales se han de enjuagar bien antes de utilizarlas. El planchado es innecesario, salvo en el caso de que se desee secar las toallas más rápidamente.

Empaque de portaobjetos nuevos. Una vez lavados y secos, los portaobjetos usados se clasifican en grupos de acuerdo con su tamaño y color, teniendo en cuenta la longitud, anchura y el grosor; después de clasificados, se empaquetan, bien apretados, en cantidades de 5, 10 ó 15. Si los paquetes contienen portaobjetos desiguales, el papel que los envuelve se rompe pronto. El Diagrama 19 muestra la diferencia entre un paquete de portaobjetos seleccionados y otro sin seleccionar.

No es recomendable guardar los portaobjetos limpios en los estuches corrientes de madera, de 25, 50 ó 100 ranuras, porque están expuestos al polvo cada vez que se abre el estuche. Además, al mover la caja constantemente se produce polvo de madera y aun de vidrio. Los estuches de mayor tamaño se han de reforzar, especialmente para el transporte o el envío por correo, y resultan voluminosos. Cada laboratorio central debiera dedicar de uno a tres estuches de esa clase para guardar portaobjetos con fines de referencia y enseñanza.¹

Manipulación, almacenamiento y transporte de los portaobjetos que contienen especímenes de sangre

Una de las ventajas del empaque moderno es que el contenido del paquete está dispuesto de manera que refuerza el envase; es decir, cajas de cartón relativamente delgado quedan firmemente reforzadas por la disposición compacta de su contenido. Salvo en el caso de aparatos extremadamente delicados, las cajas de madera o de metal, con paja o virutas, han sido sustituidas enteramente por el embalaje en cajas de cartón, "muy ajustadas", que ahorran espacio y peso.

Tan pronto estén completamente secos, los portaobjetos recién preparados se colocan en paquetes bien apretados y compactos por grupos de 8 a 15—nunca más—como se ve en el Diagrama 20.

Se cortan pedazos de cualquier papel fino y resistente, como el papel cebolla, junto con pedazos de cartón fuerte de las siguientes medidas: 11 x 21 cm; para esta operación, lo mejor es utilizar una guillotina de imprenta. Se colocan 50 de estas hojas entre dos pedazos de cartón de las dimensiones indicadas, que se sujetan con una goma, para mantener las hojas planas y los bordes iguales. La longitud del papel puede ser de unos 12 cm si se hacen paquetes de cinco portaobjetos o menos.

El número necesario o previamente determinado de portaobjetos uniformes se colocan atravesados en la parte más estrecha del papel, de modo que por cada lado sobresalga una parte igual de papel. Este se dobla sobre tres bordes del grupo de portaobjetos, a la vez que se mantiene firmemente la parte libre del papel de modo que el paquete se termina dando vuelta al grupo de portaobjetos hacia

¹ Véase el Apéndice 11, pág. 110.

la parte libre del papel. Luego se doblan los extremos del papel y se aprietan firmemente contra los extremos del paquete. Se comprenderá la importancia de que los bordes sean uniformes, ya que, de esta manera, el paquete, de preparación compacta, se puede mantener en una posición firme.

Cualquier intento de introducir papel entre los portaobjetos contradice el principio mismo del empaque. El método de envolver los portaobjetos en papel higiénico da lugar a paquetes flojos, en comparación con el que acaba de describirse, además de lo engorroso que resulta envolver y desenvolver los portaobjetos. Los portaobjetos con muestras de sangre resistirán mejor el transporte si se empaquetan de este modo, que reduce al mínimo el movimiento entre ellos.

Cualquier identificación que sea necesaria se escribe con un lápiz blando en el "borde" de esos paquetes, a fin de que no sea necesario abrirlos para identificar el contenido. (En los paquetes de portaobjetos recién limpios se debe indicar también la fecha en que se limpiaron.) Estos bloques o paquetes de portaobjetos se guardan en las cajas de cartón en que se recibieron, ya sea en la caja abierta o en la parte inferior o en la tapa de la misma. Los "moldes de

DIAGRAMA 20

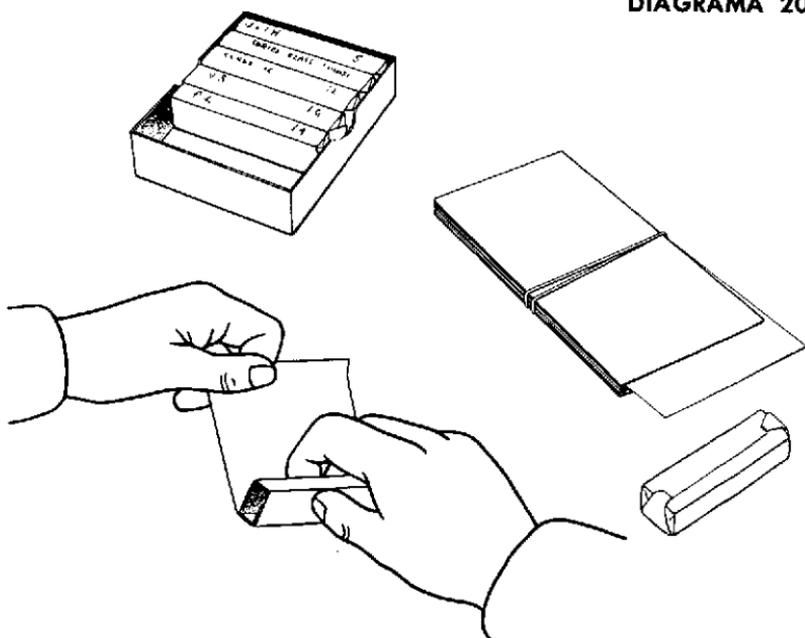
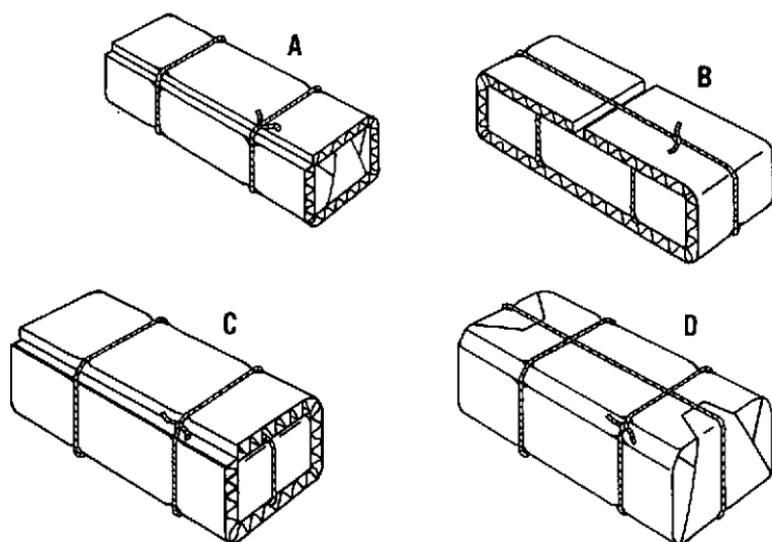


DIAGRAMA 21



horno" metálicos, rectangulares, de 18 x 28 x 3,5 cm, pueden usarse para almacenar una cantidad de paquetes de portaobjetos fácilmente manejable, teniendo en cuenta su peso.

Las cajas de cartón para portaobjetos, llenas de estos paquetes, forman el embalaje más compacto y apropiado para el transporte. Sólo se necesita colocar cartón acanalado bien cortado para cubrir todos los lados, y atarlo fuertemente con un cordel, antes de envolver la caja en papel fuerte de empacar.

Los paquetes sueltos, o una cantidad de portaobjetos menor que la necesaria para llenar una de esas cajas, pueden embalsarse por separado empleando tiras de cartón de anchura apropiada. Las tiras de cartón acanalado se cortan de diversa anchura, con una hoja de afeitar tipo "Gem", adaptada a un mango, o, mejor todavía, con una guillotina de imprenta. Hay dos tipos principales: de 2,5 a 7,5 cm de ancho, aproximadamente, en piezas sucesivas, cada una 0,5 cm más ancha que la anterior. Los canales del cartón han de estar en posición transversal y la longitud no ha de exceder de 60 cm. Luego, estas piezas se cortan de acuerdo con el tamaño del paquete o paquetes de portaobjetos. Las tiras se colocan alternadamente en cada eje longitudinal y se atan por separado, hasta que se logre cubrir suficientemente la masa de vidrio (véase el Diagrama 21). Finalmente, todo ello se envuelve con papel de emba-

lar. Estos paquetes pueden resistir una caída desde gran altura contra metales, piedras o cemento.

Un embalaje acostumbrado para enviar solamente uno o dos portaobjetos es la caja de *madera* reversible A.H.T. 7056. Tanto si se usa por pares como en serie, sólo exige una envoltura exterior de papel. No obstante, para mayor seguridad, se puede colocar una capa de cartón a cada lado de estos embalajes, sujetándola con un papel fuerte de empacar, en vez de confiar solamente en el sobre de correo.

Hay que recordar siempre que las muestras de sangre en los portaobjetos representan un importante gasto de tiempo y esfuerzo, así como considerables desplazamientos por parte de quien las tomó. Debe hacerse todo lo posible para asegurarse de que esos esfuerzos no se perderán por extravío o rotura de los portaobjetos.

Los embalajes de cartón Adams A-1615, para dos o cuatro portaobjetos, pueden ser muy útiles para el personal de campo, en cuanto a la protección de los portaobjetos contra las moscas, etc., hasta que estén secos y se empaqueten provisionalmente.

Las bandejas Adams A-1605, para 20 portaobjetos, permiten distribuir y recoger rápidamente los portaobjetos usados por estudiantes o para el adiestramiento.

Una excelente caja para 25 portaobjetos, fabricada con poliestireno por LaPine Co. (A. H. Thomas N° 7059-B), es conveniente para la rápida manipulación de portaobjetos destinados a la enseñanza. Hay más espacio entre los portaobjetos que en las cajas corrientes de baquelita, y el poliestireno es menos quebradizo.

Los estuches corrientes de portaobjetos, con ranuras para 25, 50 ó 100, resultan más útiles para el almacenamiento de material de demostración y especial que para su empleo en el campo, donde los portaobjetos están expuestos al polvo, a la humedad y a las moscas.

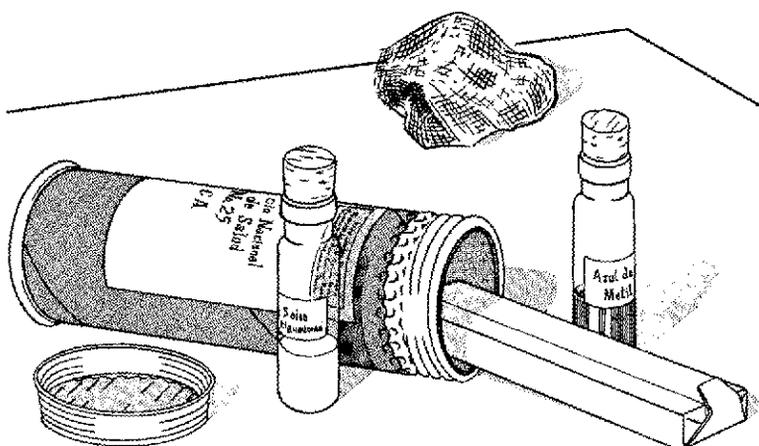
Los portaobjetos positivos y otros de material excepcional o de especial interés han de almacenarse de manera uniforme y deben llevar etiquetas claras, a fin de identificar sin dificultad a los individuos o grupos a que pertenecen.

Con frecuencia se puede disponer de envases tubulares de cartón con tapa de rosca y base metálica que miden 12 x 3 cm. Estos envases pueden contener un paquete de 15 portaobjetos o dos paquetes de 7 cada uno, con las correspondientes tiras de papel bien dobladas.

Este mismo envase se puede utilizar para portaobjetos y tubos destinados a colaboradores que se encuentren en lugares tan dis-

tantes que los portaobjetos con muestras de sangre no pueden llegar al laboratorio en menos de cinco días. El envase contiene un paquete de tres portaobjetos limpios y tres tiras de papel dobladas, junto con dos pequeños frascos bien taponados de 4,5 x 1,2 cm (véase el Diagrama 22). Uno de estos frascos contiene 5 cc de solución de azul de metileno fosfatado, y el otro sales amortiguadoras secas (0,2 gm) suficientes para disolver en una botella, como las de refrescos o cerveza, que contenga agua destilada o agua de lluvia.

DIAGRAMA 22



Envoltura para el almacenamiento en frigoríficos. Las gotas gruesas de sangre no coloreadas se secan bien primero y luego se envuelven debidamente en papel cebolla en paquetes de 15 portaobjetos como máximo. Las puntas dobladas se fijan con una cinta adhesiva plástica angosta, de 1 cm de ancho y 2,5 cm de largo.

En seguida, el paquete se envuelve en papel de aluminio de 22 x 11 cm, doblándose los extremos en forma conveniente.

En una cartulina blanca se escribe a máquina una breve descripción del contenido y se coloca sobre los bordes del portaobjetos antes de envolverlo finalmente en papel de cera de 28 x 12 cm, de modo que la identificación pueda verse a través del papel. También en este caso, conviene doblar los extremos y sujetarlos con cinta adhesiva plástica.

PARTE IV

Servicios de laboratorio

17. SERVICIOS DE LABORATORIO

La finalidad de un laboratorio de diagnóstico de la malaria es examinar, de una manera competente y rápida, el mayor número posible de muestras de sangre. Además, el laboratorio debe tener a su cargo todos los aspectos relativos a esta labor especializada.

Hay que tener siempre presente que el examen de una muestra de sangre para determinar la presencia de parásitos es, realmente, una prueba poco satisfactoria cuando el número de parásitos es muy reducido. Por consiguiente, se debe adoptar un tipo de examen mínimo, como por ejemplo 100 campos microscópicos por gota gruesa, a fin de no perder tiempo en análisis inútiles de sangre negativa.

Para que un servicio de laboratorio funcione de manera satisfactoria, es importante que todo el personal supervisor sepa exactamente lo que puede esperarse de los microscopistas y cuáles son sus limitaciones. Los jefes inmediatos del laboratorio han de recibir la suficiente instrucción técnica en cuanto a los procedimientos, a fin de que cada uno de ellos pueda descubrir las pequeñas desviaciones de los métodos prescritos y corregirlas antes de que afecten la calidad general de la labor. Ejemplo de ello es el caso del microscopista que pide o utiliza algún producto contenido en una botella sin marbete, facilitada por el mozo de limpieza o por cualquier otra persona sin preparación alguna.

Asimismo, se deben determinar previamente los principios y prácticas y estandarizar todos los procedimientos siempre que sea posible. Las modificaciones que ofrezcan mejores resultados pueden comprobarse minuciosamente en el laboratorio central y adoptarse inmediatamente después que demuestren ser satisfactorias. Esta rígida uniformidad permite la rápida inspección del equipo y de los métodos y facilita el intercambio de personal para servicios temporales de observación, estudio o relevo.

Personal

Jefe del servicio de laboratorio. Se dará preferencia para este cargo a una persona que posea el grado de Doctor en Medicina, y la selección debe hacerse atendiendo a sus aptitudes y energía más bien que a los títulos e instrucción oficial.

Este jefe del servicio de laboratorios deberá dedicar el primer mes a la práctica de todos los procedimientos de laboratorio; deberá

inspeccionar detalladamente los locales, las instalaciones, los microscopios, las lentes y todo el equipo restante de cada laboratorio bajo su supervisión, y determinar, al mismo tiempo, las limitaciones de este equipo. Exigirá el mayor grado de limpieza, y deberá estudiar y resolver las dificultades que surjan a este respecto. También deberá investigar personalmente cualquier defecto de los métodos o materiales y corregirlo debidamente. El jefe del servicio de laboratorios será la persona clave en cuanto a la contratación de colaboradores.

Técnico jefe. También en este caso, son más importantes la aptitud y la energía que los propios títulos y diplomas. Este funcionario tendrá a su cargo el laboratorio central y todos los diagnósticos; confirmará todas las placas positivas y, de vez en cuando, alguna negativa, y supervisará todos los registros e informes.

Microscopistas. El número de microscopistas dependerá del volumen de trabajo mensual, a base de un mínimo de 75 exámenes de gota gruesa por microscopista al día, más el personal que habrá de reemplazarlos durante las vacaciones y períodos de intenso trabajo. Los microscopistas se someterán, al principio del período de adiestramiento, a un examen para determinar su capacidad de diferenciar los colores.

Limpiadores. Este personal recibirá instrucción sobre las precauciones especiales que requiere este tipo de trabajo. A los que muestren un interés espontáneo se les deberá dar oportunidad de efectuar trabajos de microscopio en cuanto se familiaricen con la marcha de las actividades.

Personal de oficina. Este personal está constituido por escribientes, encargados del registro y secretarios, según los métodos utilizados en el servicio de que se trate y el volumen de trabajo.

Adiestramiento de personal

El adiestramiento de personal no debe limitarse a un curso preparativo oficial, sino que debe ser una actividad constante. El estudiante necesita dedicarse, por lo menos durante seis meses, a la observación de portaobjetos corrientes, a fin de familiarizarse con los diversos aspectos de la sangre normal. El laboratorio central puede servir de campo de adiestramiento o de internado, en que los

técnicos procedentes de lugares alejados y laboratorios particulares pueden turnarse después de aprender los procedimientos y criterios modernos.

Se debe mantener el criterio de conceder la mayor importancia a la gota gruesa y hacer caso omiso de los extendidos. Hay que desalentar al estudiante en cuanto al empleo de los términos clásicos, tales como *accolé*, tira, "infecciones mixtas", etc. Debe aprender la terminología actual y diagnosticar con precisión. Esto último abarca tres fases distintas de *P. falciparum*. En lugar de notificaciones sobre "infecciones mixtas", deben indicarse claramente las especies dominantes y subordinadas, con abreviaturas (véase la Sección 14 pág. 68). Puesto que todas las especies que no sean *falciparum* muestran las diversas fases de desarrollo en la sangre periférica, independiente del momento de extracción de la sangre, y puesto que sus gametocitos no persisten después que desaparecen las formas asexuales, resulta inútil y pedante mencionar la presencia de trofozoitos, esquizontos y gametocitos, cuando se entienden con las letras V y M (para *vivax* y *malariae*).

Al principiante se le facilitará solamente el mejor material de estudio posible, hasta que conozca completamente el diagnóstico de las especies. La calidad de los portaobjetos se puede ir reduciendo gradualmente hasta llegar a los peores, procedentes del campo.

Todo intento de combinar aspectos de extendidos sanguíneos con diagnóstico de gota gruesa se presta a confusiones y no debe permitirse. El personal debe recibir constante instrucción hasta que adquiera completa confianza en la gota gruesa sola. Para muchos, el examen minucioso de varias infecciones constituye una gran ayuda pues les facilita una sólida base para comprender que los parásitos son dinámicos, se desarrollan y reaccionan frente a su medio como cualquier otro animal. Su aspecto puede variar considerablemente, pero el comportamiento de la infección en conjunto sigue pautas muy definidas.

18. EQUIPO

Normas mínimas de calidad y cantidad, operación y mantenimiento

Para montar un laboratorio apropiado se utilizarán, naturalmente, los edificios, habitaciones u otros locales de que se disponga. En la

práctica, a menudo se dedica espacio para los trabajos entomológicos. Siempre que sea posible, el laboratorio de diagnóstico deberá estar separado de todas las demás actividades, porque la naturaleza del trabajo que se realiza requiere un medio tranquilo.

Debido a la disminución del número de muestras de sangre positivas que estimulen el interés de los investigadores a medida que disminuye la prevalencia de la malaria, el trabajo resulta cada vez más tedioso. Dentro de ciertos límites, se debe procurar la mayor comodidad a las personas que realizan esa fatigosa labor.

Para facilitar la identificación de los portaobjetos, es imprescindible disponer de una habitación amplia, bien ventilada y bien iluminada. Un ventilador eléctrico, preferiblemente en el techo, contribuye tanto al éxito de los procedimientos técnicos, como al bienestar físico de quienes trabajan en lugares calurosos y húmedos. Huelga decir que todo el local ha de estar protegido adecuadamente con tela metálica y que deben establecerse y aplicarse toda clase de medidas para el control de las moscas. En los climas húmedos, debe disponerse desde un principio de un armario que se mantenga a temperatura templada y que sea de tamaño adecuado para guardar por las noches los microscopios en uso. Debe estar provisto de bombillas eléctricas u otros dispositivos que permitan mantenerlo a una temperatura constante que no exceda de 35°C. Esto evitará eficazmente la acumulación de hongos en las lentes o prismas.

Las mesas o bancos deben ser de construcción sólida y tamaño amplio y se ha de disponer de un número suficiente de ellos. Los bordes de las mesas deben estar bien redondeados, a fin de proteger los antebrazos de las personas que usan los microscopios; la parte superior debe estar pintada de color negro opaco; y habrá de tener de 75 a 85 cm de alto y un ancho mínimo de 80 cm lo que permitirá usar la mayoría de los tipos de iluminación.

No es esencial, ni siquiera preferible disponer de mobiliario especial de laboratorio. Una mesa de fabricación casera, estable, sólida, con un travesaño cómodo para descansar los pies, suele ser más conveniente que los tipos de escritorio o banco diseñados especialmente para uso de laboratorio.

Además de la mesa con travesaño y *amplio espacio para las rodillas*, se deben proporcionar sillas, taburetes, u otra clase de asientos que se puedan adaptar a la estatura de la persona que los utiliza, tales como las sillas ajustables de escritorio, o se pueden utilizar almohadillas de manera que la postura no cause fatiga innecesaria. A este fin, suele ser conveniente disponer de taburetes

de diferentes alturas.

Asimismo, es indispensable contar con uno o más lavaderos con agua corriente, puesto que la limpieza de los portaobjetos y de toda la cristalería que se usa para la coloración es de la mayor importancia. Resulta muy conveniente tener un gabinete o estantería que se cierre herméticamente para guardar la cristalería, botellas de colorantes y otros reactivos, y también disponer de archivadores y de un escritorio para los trabajos de secretaría y registro.

Si se usa una balanza o báscula de buena calidad, se necesitará una mesa pequeña, independiente y firme, para evitar los daños que pudiera causar el movimiento constante.

Hay que disponer constantemente de suficiente agua destilada. Quizá sea necesario recoger debidamente agua de lluvia y conservarla en grandes recipientes de cristal. Una destiladora eléctrica moderna proporciona abundante agua destilada de excelente calidad. Las desmineralizadoras (desionizadoras en cápsulas) permiten obtener agua completamente apropiada para la coloración de la sangre en forma más sencilla que mediante las destiladoras.

A continuación figura una lista del equipo básico necesario para un solo investigador. Puede aumentarse en proporción al número de microscopistas que se calcule que trabajarán en el laboratorio.

Lista de equipo de laboratorio para un solo microscopista

(Multiplíquese por el número de microscopistas y estudiantes.)

1 microscopio binocular, limpio, con lentes apropiadas para el factor de multiplicación dado para su cuerpo binocular, por ejemplo:

<i>Factor</i>	<i>Ocular</i>
1,6x	4,5x
1,5x	5x
1,25x	6x
1x = ningún factor	7x, 7,5x, 8x (máximo)

- 1 carro mecánico, sólido y de fácil funcionamiento.
- 1 cubierta de plástico para proteger del polvo.
- 1 fuente de luz abundante de color blanco azulado.

Los iluminadores empotrados que usen bombillas transparentes (especiales) y de menos de 25 vatios son inadecuados. Se debe disponer de filtros de vidrio fino esmerilado, azul claro, para el microscopio y el iluminador. La lámpara de la American Optical, tipo "Chalet", sin el cristal esmerilado y los filtros azules, se puede combinar con un matraz, de bola, lleno de agua teñida de azul, lo cual da una excelente luz si en este tipo de lámpara se usa una bombilla de vidrio esmerilado ordinaria de 100 vatios. La parte superior plana de la lámpara sirve de fuente de calor para secar portaobjetos (A.H.T. 6958-E). La lámpara de fabricación casera permite obtener los mismos resultados (véase el Diagrama 16, pág. 64).

- 1 unidad de calefacción que dé una temperatura hasta de 35°C, instalada en un armario, para proteger los prismas y las lentes del microscopio contra los hongos en los climas cálidos y húmedos. A tal efecto, es indispensable disponer de un termómetro de máxima y mínima (véase el Apéndice 20, pág. 121).
- 1 pequeño frasco para aceite de inmersión Cargille tipo A, de baja viscosidad, o Crown (ordinariamente los frascos aplicadores de 20 cc con varilla de cristal, resultan mejores que los que suministran las compañías de óptica).
- 2 toallas que no desprendan pelusa, de 40 x 60 cm.
- 4 fuentes rectangulares para coloración, de 7 x 9 x 5 cm (véase el Diagrama 17, pág. 74).
- 2 lápices de grafito, blandos, No. 1.
- 1 paquete de 50 hojas de *papel cebolla* de la mejor calidad, del tipo usado para copias, 11 x 21 cm. Las hojas deberán estar colocadas entre cartones de su mismo tamaño.
- 1 cuchilla puntiaguda Bard-Parker colocada en el corcho de una botella de 60 cm con boca de 2 cm.
- 1 hoja 00 ó 000 de papel de esmeril, para mantener la punta de la cuchilla brillante, limpia y afilada.
- 1 paquete de gasa, un rollo pequeño de gasa o vendas, y si no se dispone de éste, un rollo pequeño de algodón absorbente de buena calidad y de fibra larga.

Equipo para colorear:

- 1 cronómetro de 1 min. a 2 horas, con timbre de alarma que suene hasta que se haga parar.

- 1 botella de 120 cc, de boca ancha, con una mezcla de fosfato de azul de metileno.
- 2 vasos pequeños de plástico,

de forma cilíndrica



más bien que cónica



para el agua amortiguadora de lavado.

- 1 botella de 30 cc (o frasco cuentagotas de plástico) de colorante Giemsa *bueno*.
- 1 tubo de ensayo, graduado (preferiblemente de plástico), de 10–25 cc. (Los tubos de ensayo marcados a 5, 10 y 15 cc dan el mismo buen resultado.)
- 1 bandeja de colorear, curva, o su equivalente, con depresión de 2–3 mm, o una vasija rectangular de esmalte blanco (véase el Diagrama 12–D y E, pág. 48).
- 1 botella de vidrio o plástico, de 500, 750 ó 1.000 cc de capacidad.
- 1 botella de sales de fosfato mezcladas de acuerdo con alguna proporción previamente seleccionada, como por ejemplo, 4/5; y 6 pequeños tubos con corchos, que puedan contener 0,5, 0,75 ó 1,0 gm de la mezcla.

Los tacos para que se escurran los portaobjetos son de varios tamaños y se hacen de madera de buena calidad y bien seca, de 2 a 2,5 cm de grosor, con cortes transversales de 7 mm, aproximadamente, de profundidad, e inclinados en un ángulo de 110° y con 13 mm de separación. Los cortes deben ser suficientemente amplios—1,5 mm como mínimo—para acomodar portaobjetos gruesos. Un taco de 2,5 x 20 cm podrá acomodar unos pocos portaobjetos, mientras que uno de 15 x 22 cm podrá contener unos 100.

- 1 paquete de toallas de papel.
- 1 caja de material plástico para 25 portaobjetos que pueda contener gotas gruesas de sangre para demostración.
- 1 hoja de afeitar tipo "Gem".
- 2 piezas de cartón ordinario de empacar (acanalado). Varios artículos necesarios para transportar, secar y empacar portaobjetos (cordel y papel de estraza para envolver).

Artículos complementarios para un laboratorio de zona o central

- 1 objetivo de repuesto de inmersión en aceite y 10 pares de lentes de 7x ó 7,5x si se van a usar microscopios que carecen de lentes intermedias.
- 1 marcador ajustable para trazar círculos a los objetos microscópicos, para cada microscopio (véase el Apéndice 16, pág. 115).
- 12-24 botellas Florence de 250-300 cc.
- 1 lámina AO-seudoisocromática para la prueba de visión de los colores.
- 50 tacos de madera de 1 cm y 2 cm de grosor y 6-8 cm² (25 de cada grosor).
- Corchos de repuesto para todos los tipos de botella.
- 36 botellas cuentagotas plásticas (véase el Apéndice 12, pág. 112).
- 1 botella cuentagotas de 30-60 cc para tolueno puro, por cada tres estudiantes.
- 1 vasija oblonga, esmaltada, para colorear, de 35 x 25 x 8 cm, por cada tres estudiantes, o 12 láminas de plástico curvas.
- ½ litro de aceite Cargille o Crown (de la menor densidad).
- Giemsa—ya sea solución madre de 30 cc de alta calidad comprobada de Giemsa, o 4 botellas de 5 gm de un lote comprobado de polvos de Giemsa, tales como National Aniline NGe 18.
- 3 botellas de 400 gm de alcohol metílico puro, libre de acetona, de la mejor calidad.
- 1 kilo de glicerina pura de la mejor calidad.
- 200 gm de cuentas de cristal sólidas, de 5 ó 6 mm de diámetro.

Sales para aguas amortiguadoras:

- 8 botellas de 100 gm de Na₂HPO₄, *anhidro*.
- 400 gm de polvo fino o cristales de KH₂PO₄.
- 10 gm de azul de metileno, medicinal o de la mejor calidad que pueda obtenerse.
- 1 botella de polietileno si es posible, de 2 litros de ácido crómico (dicromato de potasio y ácido sulfúrico).
- 1 embudo de porcelana o cristal de 7,5 cm para recoger el ácido crómico sobrante de las bandejas rectangulares de colorear.
- 3 litros de alcohol de 90-95% para limpiar los portaobjetos.
- Vasijas esmaltadas o de plástico para la solución detergente en que se colocan los portaobjetos utilizados.
- 1-2 cubos esmaltados o plásticos.

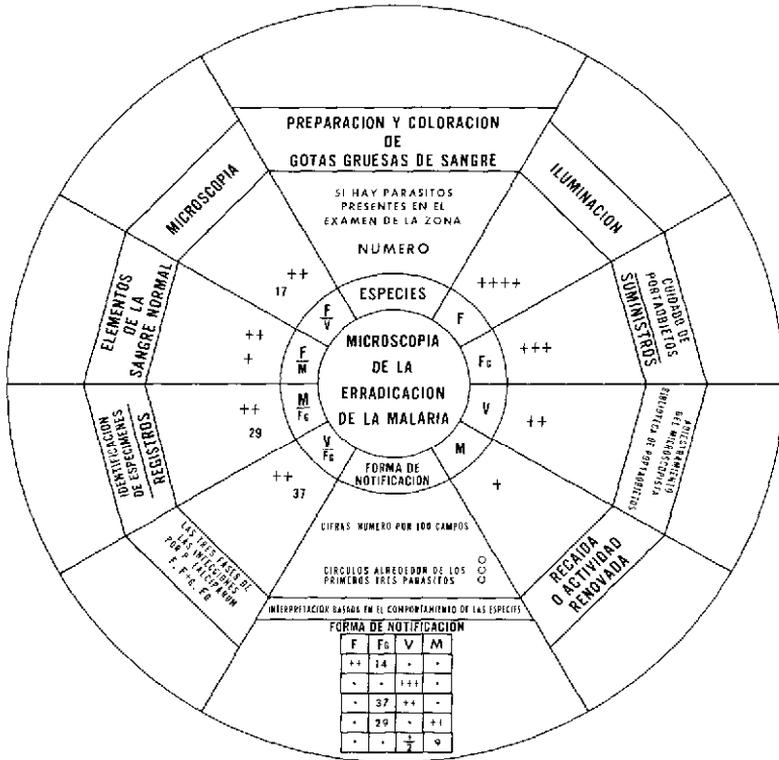
APENDICES

Los diez "pecados mortales" en la microscopia de la gota gruesa

1. POCA NITIDEZ
2. ILUMINACION INADECUADA
3. NO MOVER EL TORNILLO MICROMETRICO CONSTANTEMENTE
4. EFECTUAR CUALQUIER AJUSTE DEL SISTEMA DE ILUMINACION QUE PERMITA EL DESPLAZAMIENTO RADIAL DE LOS LEUCOCITOS
5. NO FAMILIARIZARSE CON EL ASPECTO DE LOS LEUCOCITOS, PLAQUETAS Y RESTOS DE ERITROCITOS QUE SE ENCUENTRAN EN CUALQUIER PREPARACION QUE HAYA DE OBSERVARSE
6. PERDER TIEMPO OBSERVANDO IMAGENES DUDOSAS O CAMPOS MAL TEÑIDOS
7. USAR ESPEJO CONCAVO
8. USAR PORTAOBJETOS, FRASCOS O BOTELLAS SIN ETIQUETAS
9. NO PROTEGER CONTRA EL AGUA, EN CUALQUIER PROPORCION, LAS SOLUCIONES ALCOHOLICAS DE COLORANTE
10. NO DEJAR EL OBJETIVO 10x EN POSICION DE TRABAJO CUANDO SE VA A TRANSPORTAR O A GUARDAR EL MICROSCOPIO

Apéndice 1

LA MICROSCOPIA DE LA ERRADICACION DE LA MALARIA



En este diagrama figuran los principales aspectos analizados en el presente Manual para el diagnóstico moderno de la malaria, basado totalmente en una gota gruesa de sangre bien preparada y coloreada.

En un programa de erradicación es indispensable volver a examinar una parte de los especímenes tomados, es decir, todas las láminas positivas y distintas cantidades de las negativas. Para esto es necesario quitar el aceite del portaobjetos y almacenar todos éstos después del primer examen.

En el pasado, cuando se declaraba "positiva" una muestra de sangre, lo primero que se preguntaba era "¿Qué especies están presentes?". Hoy se pregunta "¿Cuántos parásitos hay?", ya que si son numerosos es mucho más probable que el diagnóstico de las especies esté correcto, mientras que si el número es escaso el diagnóstico puede ser incierto y generalmente el nuevo examen se prolonga. Se está prestando cada vez más atención a las infecciones escasas, pues hoy día el descubrimiento de un solo caso en determinada área puede ser más importante que la localización de una docena o una centena de casos hace 20 años.

En el diagrama se procura también mostrar, mediante el empleo de abreviaturas, cómo se pueden registrar, en forma completa, pero sencilla, los resultados del análisis de muestras de sangre.

Apéndice 2

EL COMPORTAMIENTO DE LOS GAMETOCITOS DEL P. FALCIPARUM

CASO NO.	DIAS												SEMANAS						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7
1	154 _x	117 _x	7	1	0	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	
2	137 _x	67 _x	34	0	0	0	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	59 _x	39 _x	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	62 _x	17 _x	24	5	1	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	82	372	84	12	2	15	0												

CIFRAS - NUMERO DE GAMETOCITOS POR 100 CAMPOS DE GOTAS GRUESAS

Tres a cinco semanas antes de efectuarse, en 1949, las observaciones arriba mencionadas, cuatro muchachos jóvenes ingirieron cantidades desconocidas de proguanil y quinina, probablemente sólo hasta que desapareció la fiebre. El primer muchacho fue localizado mediante una encuesta escolar habitual y los otros se encontraron más tarde en una misma familia.

Cada uno de ellos recibió 10 mg de iso-pentaquina durante los dos primeros días después de haberse tomado la muestra de sangre (lo que se indica con la x pequeña en las primeras dos columnas).

El 12° día, el Caso N° 1 se quejó de algunos síntomas y en la sangre aparecieron unos pocos anillos. El Caso N° 4 registraba +F. El día 13° todos recibieron cantidades adecuadas de amodiaquina en una dosis única.

En los 7 exámenes semanales subsiguientes ya no aparecieron más anillos.

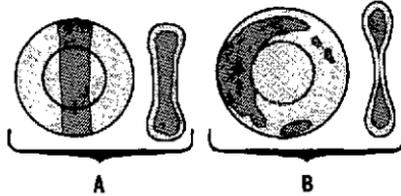
Del diagrama adjunto se deduce lo siguiente:

1. Los gametocitos raras veces aparecen antes de la segunda semana de parasitemia;
2. Desaparecen espontáneamente después de la 5-7 semanas; o
3. Desaparecen en el término de 72 horas después de la ingestión de drogas del tipo de la primaquina.

De lo que antecede se concluye que, en las áreas de transmisión reducida es más importante administrar cantidades adecuadas de drogas esquizontocidas el primer día del tratamiento, que una droga específica contra los gametocitos ulteriormente.

Apéndice 3

GLOBULOS ROJOS EN FORMA DE ROSCA



A)-Glóbulo rojo normal, de frente y de costado

B)-Glóbulo rojo más joven, aumentado, en el que la parte central es extremadamente delgada. El parásito está representado como la parte central del glóbulo en A) y ocupa sólo la parte periférica en B).

Es preciso dar algunas explicaciones acerca de la forma alterada de los parásitos bien desarrollados de *P. vivax* y de *P. malariae*, debido al tipo de célula en que se encuentran.

En el precedente diagrama esquemático se ha procurado demostrar el tamaño y la forma, tanto de frente como de costado, de los glóbulos rojos normales (A). La destrucción de muchos glóbulos rojos por reiteradas esquizogonias provoca la anemia que, a medida que se acentúa, contribuye a que lleguen a la circulación glóbulos rojos incompletamente desarrollados y en número creciente. No pocas veces, los glóbulos rojos, de tamaño mayor que el corriente (B), muestran una marcada constricción en la parte central en contraste con las células normales. En vez de aparecer como discos gruesos bicóncavos, semejan cámaras de neumático infladas o un pastel de "roscas". También se encuentran glóbulos rojos jóvenes azulados de formas semejantes.

Evidentemente las membranas celulares opuestas están tan juntas que la hemoglobina y otros elementos se ven empujados hacia la periferia. El aspecto resultante, según la cantidad del material parasitario presente, será como el representado por la parte sombreada en la figura (B).

El estudiante debe comprender que la alteración del parásito por la forma de la célula que lo contiene, no indica un comportamiento típico del *P. vivax* o del *P. malariae*.

Apéndice 4

DESCRIPCIONES DIAGRAMATICAS DE LOS PARASITOS OBSERVADOS

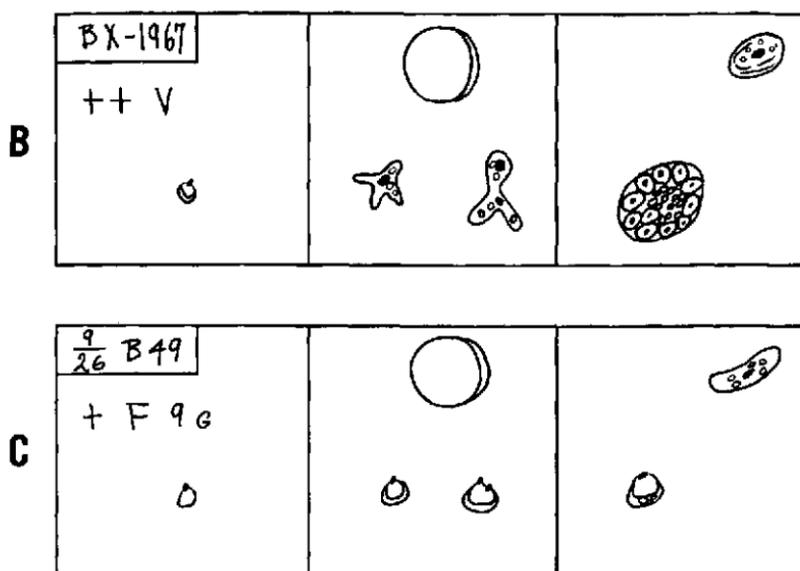
A

IDENTIFICACION DEL PORTAOBJETOS		
NO. APROXIMADO DE ESPECIES DE PARASITOS	TAMAÑO DE LINFOCITO PEQUEÑO	
MAS PEQUEÑO	2 MAS NUMEROSOS	MAYOR

Este diagrama se utiliza para ayudar al estudiante a aprender las diversas formas de desarrollo de los parásitos que pueden presentarse en una misma gota de sangre. Para uso del estudiante, se facilitan formularios individuales mimeografiados, iguales al presentado en el Diagrama A, y se completa uno por cada muestra de sangre desconocida que se examine hasta que el estudiante haya aprendido bien a representarse la diferencia de crecimiento de cada portaobjetos de estudio que examine.

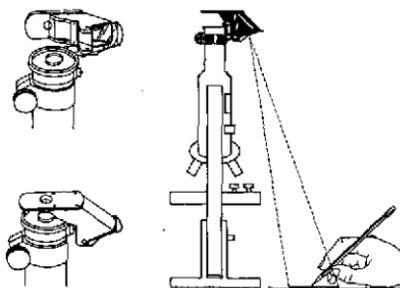
En el formulario mimeografiado, de 18 x 5 cm y dividido en tres partes iguales, el círculo de 8 mm de diámetro que se observa en la parte superior del cuadrado central representa el tamaño de un linfocito pequeño. La identificación del portaobjetos observado se escribe en el pequeño rectángulo en la parte superior del primer cuadrado. Cuando se completa el examen, deberá indicarse debajo de dicho rectángulo el número aproximado de parásitos presentes y el diagnóstico de las especies.

Para completar el examen, el estudiante examina meticulosamente la gota gruesa de sangre hasta observar los detalles de 30 a 300 parásitos (según el número de parásitos presentes). Después de apagar la lámpara del microscopio, el estudiante dibuja *de memoria*, en forma esquemática, cuatro figuras que representarán: a) el parásito más pequeño encontrado (dibujado en el primer cuadrado); b) dos ejemplares de la fase más numerosa en que éste se encuentra (en el segundo cuadrado); y c) la mayor de las formas en desarrollo que se observen (en el tercer cuadrado). Sólo se registran las formas asexuales en desarrollo. Si se desea dejar constancia de la presencia de gametocitos maduros, se puede dibujar uno de éstos en miniatura, en el extremo superior derecho del tercer cuadrado.



Conviene señalar categóricamente que NO se requieren dibujos artísticos de cada parásito. Lo importante es cuidar que los dibujos guarden proporción con el tamaño del círculo que representa un linfocito pequeño. Una vez indicado el tamaño, debe representarse la posición del fragmento o de los fragmentos de cromatina. Se podrían usar dos o tres círculos pequeños para indicar la presencia del pigmento.

A fin de que el estudiante se forme rápidamente algún concepto del tamaño del parásito en el microscopio, debe dársele la oportuni-

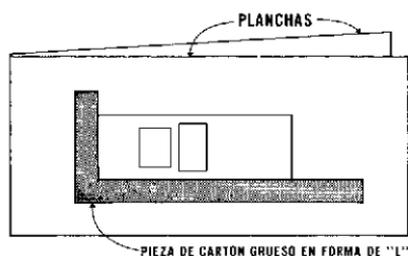


dad de observar, con la cámara lúcida, por lo menos una muestra de sangre que contenga parásitos. Este instrumento, cuando está debidamente ajustado, a través del prisma, proyecta sobre el papel colocado al lado del microscopio cualesquier objetos que se vean en el campo microscópico. Es entonces relativamente sencillo dibujar los contornos de un linfocito pequeño y de los parásitos que se encuentran a su alrededor.

Los Diagramas 6-8 (véase las págs. 24, 26, 27) se prepararon en esta forma.

Apéndice 5

MODELOS O GUIAS



Los modelos, guías o estructuras—cualquiera que sea el nombre que se les dé—son indispensables para enseñar a preparar debidamente gotas gruesas buenas y uniformes, que contengan un frotis parcial delgado para ser utilizado como marbete y en el cual la identificación pueda escribirse con un lápiz suave.

Se toma un cartón grueso y se corta en una extensión de 15,2 cm y éste se recorta en tres pedazos pequeños de 9,50 x 15,2 cm cada uno. De otro pedazo de cartón grueso, firme y consistente (como los utilizados en ficheros) se corta una "L" cuyo brazo vertical tenga 4,5 cm de altura y el horizontal 9 cm, siendo la anchura de ambos de 1 cm. Esta "L" se pega en un cartón grueso a un 2,5 cm de su extremidad, como se indica en el diagrama, y se deja secar bien.

En seguida, se fija un portaobjetos de cristal en la "L" y se dibujan los contornos de su parte superior e inferior con una línea suave sobre la carpeta de cartón. A una distancia de 2 cm del extremo izquierdo del portaobjetos se dibuja una línea vertical de 1,5 cm sobre el cartón, equidistante de los bordes del portaobjetos. Según el tamaño de la gota gruesa que se desee obtener, se forma un rectángulo o un cuadrado, como se indica en el diagrama. A 3 mm a la derecha se dibuja un rectángulo más grande, de tamaño proporcional al número de letras o cifras de la identificación que ha de usarse, o suficientemente grande para colocar las iniciales del sujeto y la fecha.

Con estos dos diseños claramente marcados en el cartón, el principiante coloca un portaobjetos limpio en el ángulo de la "L" y observa en qué parte de éste debe tocar la sangre para que quede a la izquierda del centro del cuadrado que denota los límites de la gota gruesa. Si le es posible, con la muestra de sangre que ha tomado, extiende rápidamente la sangre sobre el portaobjetos dentro de los límites del rectángulo. El marbete de identificación se escribe en el portaobjetos, en el espacio indicado por el rectángulo de la derecha.

Los dibujos trazados sobre este modelo deben ser nítidos y de trazos bien definidos, pues no se trata de dibujar lo que debería ser el portaobjetos definitivo, sino de disponer de un medio para que las muestras de sangre se coloquen siempre en la misma posición sobre el portaobjetos.

Apéndice 6

EL FENOMENO DE LA COLORACION DE SCHÜFFNER

En los frotis o extendidos de *P. vivax* y *P. ovale* bien coloreados, los glóbulos rojos que contienen parásitos revelan la presencia de gránulos rojizos que se conocen con el nombre de granulación de Schüffner. En las gotas gruesas de sangre igualmente bien coloreadas, es frecuente observar alrededor de los parásitos una aureola rosa de forma semejante al glóbulo rojo en el que se encuentran. Esto es lo que se llama el proceso de coloración de Schüffner, ya que los gránulos raras veces se pueden distinguir, a menos que se emplee la técnica salina de Shute.

No se tiene conocimiento de que se observen aspectos semejantes en los parásitos *P. malariae* en la gota gruesa de sangre.

Algunas veces se observa una sombra rosa del glóbulo rojo en la sangre que contiene los anillos de *P. falciparum*. Estas gotas gruesas suelen estar excesivamente coloreadas, o revelan alguna variación en su coloración, o incluso descoloración.

En todo caso, el diagnóstico se basa *siempre* en el conjunto de las formas de desarrollo que aparecen simultáneamente y no en el aspecto del glóbulo rojo coloreado.

Apéndice 7

PRUEBA RAPIDA DE LA CALIDAD DEL COLORANTE DE GIEMSA LIQUIDO

Para esta prueba, lo único que se necesita es papel filtro N° 2 circular de Whatman, de 10 a 12 cm (útese el N° 1 si es el único papel disponible) y un cuentagotas con alcohol metílico puro.

En el centro del papel filtro se colocan una o dos gotas de la solución de Giemsa concentrada. Luego se dejan caer dos o tres gotas de alcohol metílico puro sobre la mancha oscura, que empieza a agrandarse lentamente.

Se forman entonces tres círculos concéntricos (de 5 a 7 cm de diámetro), a saber:

1. Un círculo exterior angosto, rojo o rosa (eosina).
2. Un círculo medio, ancho, rojo-azulado (azul de metileno).
3. Un círculo interior angosto, azul fuerte (azul de metileno).

En los casos de colorantes deteriorados, nunca se ven todos los tres círculos.

Apéndice 8

LA TECNICA DE LA COLORACION SALINA DE SHUTE

En 1955, Shute diluyó accidentalmente un poco de colorante de Giemsa con solución salina normal (0,85%) para la coloración de frotis o extendidos y se sorprendió de la excelente coloración del parásito, así como de la granulación, cuando éstos estaban presentes. Pronto comprobó que se podían obtener resultados análogos con una gota gruesa de sangre.

El efecto deshemoglobinizador es evidentemente mucho más eficaz que cuando se usan las soluciones amortiguadoras habituales y, al parecer, se logran mejores resultados cuando los portaobjetos se han dejado sin colorear durante un largo período. Los restos de los glóbulos rojos jóvenes no son tan patentes; el campo es extraordinariamente claro y los parásitos se pueden localizar con más facilidad. Cada gránulo de Schüffner se ve en forma clara y precisa cuando la coloración dura 30 minutos o más.

Parecería conveniente que las personas que no estén familiarizadas con este tipo de coloración examinen sin demora las posibilidades de emplearlo teniendo en cuenta las condiciones locales. Quizá puedan introducirse algunas modificaciones menores a fin de reducir el tiempo de la coloración y la cantidad de colorante de Giemsa usado. Es evidente que el principio tiene grandes ventajas.

A continuación se reproducen las instrucciones dadas en el libro de Shute: ¹

El colorante se prepara en las siguientes proporciones:

6 cc de colorante de Giemsa por cada 100 cc de solución de NaCl al 0,85% [pH 7,0].

Colorante en la posición invertida, en bloques de 25-50; o en platinillos de coloración—30-60 minutos.

Enjuáguese con agua de grifo, escúrrase y séquese.

Usese el colorante repetidamente mientras no se obtengan los resultados deseados.

La preparación de proporciones secas de sal y sales amortiguadoras no constituye un procedimiento práctico, debido a la ínfima cantidad que se requiere de estas últimas sales. Las siguientes lecturas de pH se obtuvieron agregando 1% de fosfato de monohidrógeno disódico a 500 cc de solución salina normal:

0,85 cc—7,2

0,65 cc—7,1

0,4 cc—7,0

Apéndice 9

LA COLORACION DE FROTIS

Los frotis o extendidos son útiles para demostrar algunos aspectos especiales de los parásitos de la malaria y de los glóbulos rojos en que se encuentran. Además, para demostrar una hematología poco corriente, la existencia de parásitos en la médula ósea, o raspaduras cutáneas, se preparan durante la autopsia frotis de la superficie cortada de la placenta y del cerebro, bazo o hígado. Para la coloración de estos frotis puede ser conveniente emplear cualquiera de los dos métodos indicados a continuación:

¹ *Laboratory Technique for the Study of Malaria*. Percy G. Shute y Marjorie E. Maryon. J. and A. Churchill Ltd., Londres, 1960.

- A. Fijación con alcohol y coloración con colorante de Giemsa en agua amortiguadora.
- B. Coloración con colorante de Wright o de Leishman diluido con agua adecuadamente neutralizada.

El primer procedimiento es más común, pero el segundo puede ofrecer resultados hematológicos mejores.

Tal vez sea necesario utilizar una solución amortiguadora especial de proporciones de 3:5 a 5:5, en lugar de la proporción habitual de 6:5, para obtener la coloración de la granulación de Schüffner.

El agua neutralizada se prepara añadiendo de 20 a 40 gotas de solución roja de fenol a 100–300 ml de agua destilada. Se agrega carbonato de litio (0,2%) gota a gota, hasta obtener un color rosa-violeta que permanezca así después de agitar bien la solución; el color debe permanecer inalterado durante unos 20 minutos y si se aclara rápidamente debe añadirse más carbonato de litio. El pH varía entre 6,6 y 7,4, y el color que da buenos resultados con un determinado lote de colorante de Wright es el que se necesita, cualquiera que sea su pH.

Método A

1. Fíjense los extendidos con alcohol metílico puro.
2. Colóquense los portaobjetos sobre varillas de vidrio horizontales, a una distancia de 5 cm uno de otro.
3. Cúbranse con colorante de Giemsa fresco preparado con una gota de Giemsa por cada cc de agua amortiguadora en proporción 4:5.
4. Coloréense durante 30–60 minutos.
5. Enjuáguese el colorante con abundante cantidad de agua amortiguadora en proporción 4:5.
6. Déjese escurrir o elimínese el exceso de agua con papel secante.
7. Séquense los frotis con calor suave.

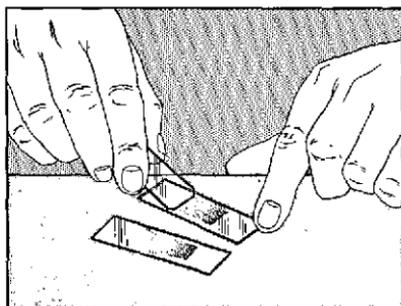
Método B

1. Colóquense los portaobjetos sobre varillas de vidrio horizontales.
2. Cúbranse con colorante de Wright o de Leishman puro.
3. Agréguese 1–2 volúmenes de agua neutralizada.
4. Mézclase moviendo suavemente las varillas. No se debe soplar.

5. Enjuáguese el colorante después de 20–30 minutos con abundantes cantidades del mismo diluyente.
6. Déjese escurrir o elimínese el exceso de agua con papel secante.
7. Séquense los frotis con calor suave.

Con cualquiera de los dos métodos de coloración los glóbulos rojos se muestran de color de ante.

Cuando sea necesario preparar frotis o extendidos, conviene emplear portaobjetos Clay-Adams N° A-1463, de bordes redondeados, como lámina para extender la sangre (véase el diagrama que sigue).



PORTAOBJETOS DE BORDES REDONDEADOS

Apéndice 10

RECOLORACION DE GOTAS GRUESAS DE SANGRE

Algunas gotas gruesas de sangre se descoloran con más rapidez que otras. Incluso en las preparaciones recién coloreadas, se aconseja al examinador que observe el borde de la gota gruesa para lograr un contraste mejor en los colores. La falta de coloración en la parte central bien puede deberse a la lentitud con que se seca esa parte debido a su grosor o a una elevada humedad. La absorción de CO_2 del aire continúa mientras la sangre esté húmeda y tal vez contribuya a la ausencia del color rojo en el centro de muchas gotas gruesas. Es preciso tener en cuenta también otros factores como la limpieza de los portaobjetos, la calidad del colorante, si el agua amortiguadora es adecuada y, especialmente, la reacción del medio en que se ha montado la gota de sangre.

En algunos casos, un portaobjetos o grupos de portaobjetos, e incluso juegos completos de portaobjetos para fines didácticos, se han inutilizado en tres meses o menos. Evidentemente, sólo Shute puede preparar gotas gruesas de sangre que a veces duran decenios.

Hasta ahora, la recoloración raramente ha sido satisfactoria. Sólo cuando las preparaciones se han coloreado debidamente al principio cabe esperar buenos resultados. En general, es menos probable que se descoloren las gotas gruesas que han sido más protegidas contra la luz.

El principio de la recoloración se basa en el empleo de colorantes diluidos. Dicho procedimiento requiere que el colorante se mantenga durante un período relativamente prolongado y que se utilicen soluciones amortiguadoras que contengan menos proporción de sal dibásica. Puede ser necesario ensayar soluciones amortiguadoras de las proporciones de 3:5, 2:5, 1:5 y tal vez de 0,1% de fosfato potásico antes de obtener resultados satisfactorios. Se ha logrado bastante éxito con polvo de Leishman de buena calidad preparado en la misma forma que el colorante de Giemsa (véase la pág. 50), es decir, en una solución diluida en la proporción de una gota para 3 ó 4 cc de agua amortiguadora y dejándola que actúe durante tantos períodos de 10 minutos como sean necesarios hasta que ya no se observe mejora alguna en el aspecto microscópico. Si los portaobjetos se colocan boca arriba en las varillas de coloración y se cubren con el colorante diluido, pronto quedará de manifiesto que las partes del portaobjetos que están más descoloreadas que otras o que son de un color rojo demasiado intenso, producirán la descoloración del colorante líquido que está directamente sobre ellas, del mismo modo que sucede en la gota gruesa de sangre. Debe agregarse colorante fresco y proseguirse la coloración hasta que cese la descoloración.

La descoloración de frotis raras veces plantea un problema, ya que es bien sabido que muchos conservan su color durante años. No obstante, se necesita un procedimiento para volver a colorear aquellas áreas de campos especiales que se han descolorado por el uso durante horas en demostraciones.

Apéndice 11

BIBLIOTECA DE PORTAOBJETOS PARA LA ENSEÑANZA

Si bien las infecciones maláricas son todavía bastante numerosas, sería conveniente adoptar las medidas necesarias para almacenar juegos de gotas gruesas coloreadas que podrían usarse para el adiestramiento del personal actual de microscopistas y, después de la recoloración, se continuarían empleando para la formación de aquellos cuyos servicios se necesitarán durante el período de vigilancia de tres años.

Una buena colección de portaobjetos debe consistir en juegos de 10-25 gotas gruesas, junto con dos frotis de la misma sangre tomados al mismo tiempo. Deben identificarse cuidadosamente, de modo que no revelen las especies presentes, y colorearse, empaquetarse y almacenarse sin demora en la oscuridad hasta que se necesiten. Una semana antes de usarlos, se les aplica un cubreobjetos limpio (Nº 1) con una de las nuevas resinas disueltas en tolueno puro. El "euparal verde" demora la descoloración, pero es más difícil de quitar cuando se van a colorar de nuevo los portaobjetos.

Es preciso preparar juegos de muestras de sangre que contengan una gran cantidad y un pequeño número de parásitos de cada una de las tres fases de *P. falciparum* así como de las muestras de sangre tomada en tres ocasiones distintas en el ciclo de *P. vivax* y de *P. malariae*. En los casos en que todavía no se ha dado droga antimalárica al paciente, esto puede aplazarse durante 24 horas para que pueda tomarse una segunda gota de sangre y colocarse junto a la primera 24 horas después. Debe incluirse un juego de muestras de sangre normal y uno de muestras tomadas después de haber desaparecido todos los parásitos, a fin de demostrar la existencia de los restos celulares.

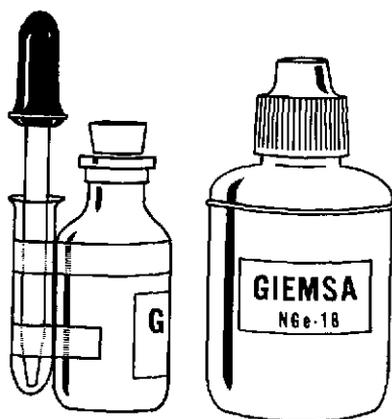
Se podrían hacer las gestiones necesarias con algunos hospitales y consultorios de pacientes externos, así como con inspectores y colaboradores de epidemiología interesados en el problema, a fin de preparar juegos de portaobjetos de pacientes en quienes el examen inmediato de la sangre revela una pauta de la infección que no se ha incluido todavía en la colección para fines didácticos. A este efecto, es muy conveniente facilitar paquetes de portaobjetos uniformes, nuevos y debidamente limpiados.

De acuerdo con algunos resultados de investigaciones actualmente en curso sobre la descoloración de portaobjetos para la ense-

ñanza, tal vez sea posible usar durante muchos meses las gotas gruesas que han sido debidamente coloreadas por el método de Field antes de descartarlas por pérdida del color. Una proporción, por lo menos, de cada juego de portaobjetos destinados a la enseñanza en clase debe ser coloreada por el método de Field, además de los preparados de acuerdo con el método usual de Giemsa a base de azul de metileno.

Apéndice 12

CUENTAGOTAS DE PLASTICO



Con los cuentagotas de plástico que ahora pueden obtenerse (con capacidad que varía de 30 cc a 150 cc), el colorante de Giemsa queda mejor protegido contra la contaminación por la humedad que en otros envases que necesitan de una pipeta para obtener el número adecuado de gotas.

Apéndice 13

LAPICES USADOS PARA HACER MARCAS EN LA SANGRE

Aunque se recomiendan los lápices de grafito del N° 1 u otros de tipo suave, para escribir los marbetes tan pronto como se haya secado la sangre, el lápiz Dixon 2225 Film Mark es excelente, ya que no contiene polvo de grafito suelto que pueda esparcirse en las partes adyacentes de la gota gruesa.

Conviene evitar el empleo de lápices grasos, ya que gran parte de la grasa puede flotar cuando los portaobjetos son sumergidos durante el proceso de coloración. Además, si se usan lápices grasos de color rojo o azul, es posible que algunos pigmentos de estos dos colores se adhieran al portaobjetos incluso después de haberse quitado el aceite.

Apéndice 14

“HUMIGRAPH”



El "humigraph" es una tarjeta con 6 círculos negros que contienen material susceptible de cambiar del color azul al rosa y viceversa. El borde de la tarjeta es de un color neutro grisáceo que varía con la humedad. Para determinar la humedad se compara el color de los círculos con el del borde.

El porcentaje de humedad se lee en la cifra del círculo cuyo color se asemeje al del borde. Si un círculo es más azul y el adyacente más rosado, la lectura será la cifra más baja, agregando 5.

El contorno del círculo con la cifra 70 puede cambiar su color a rosado. Cuando esto ocurre, la humedad es superior a 80%, lo que impedirá que se sequen pronto las gotas gruesas de sangre.

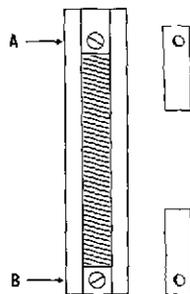
Apéndice 15

FORMA DE AJUSTAR EL TORNILLO MACROMETRICO DEL MICROSCOPIO

Cuando el tornillo macrométrico del microscopio empieza a aflojarse debido al peso del cuerpo binocular, el objetivo de inmersión en aceite no se mantendrá enfocado al quitar la mano de la cabeza del tornillo.

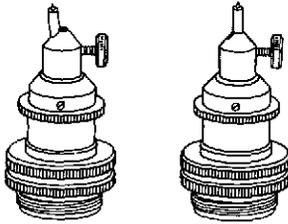
En algunos modelos de microscopios este factor puede ajustarse de inmediato girando simplemente las manecillas estriadas del tornillo macrométrico en direcciones opuestas. En otros modelos, hay dos tornillos pequeños en la plataforma, colocados directamente sobre el tornillo macrométrico, que pueden ser apretados con un destornillador pequeño adecuado hasta que la tensión sea satisfactoria.

Cuando no se disponga de ninguno de estos mecanismos reguladores, será necesario quitar la cremallera (véase el diagrama adjunto) soltando los tornillos en los puntos A y B e insertando capas convenientes de papel de estaño o aluminio para evitar el deslizamiento.



Apéndice 16

EL EMPLEO DE OBJETIVOS MARCADORES



Cada microscopista debe disponer de un objetivo marcador, que pueda dibujar un círculo por lo menos tan pequeño como el campo microscópico visto con objetivo de inmersión en aceite. Como mínimo, debe haber uno de estos marcadores para cada tres microscopistas que trabajen juntos. Cuando se utilizan debidamente, los objetivos marcadores representan una considerable economía de tiempo al examinar los resultados. En el caso de objetos dudosos, se puede colocar un círculo alrededor de ellos a fin de remitirlos al laboratorio central y éste puede a su vez marcar con un círculo aquellos objetos que desea devolver al examinador original. Los marcadores se usan comúnmente en el caso de infecciones menores con pocos parásitos.

Una vez que se inicia la búsqueda de parásitos, el microscopista debe llevar un registro del número de campos examinados. Si el examinador no encuentra parásitos en los primeros 25 campos, se dará cuenta que, de existir la infección, ésta debe contener un número escaso de parásitos. Cuando el número de parásitos es pequeño, no siempre es fácil determinar las especies, y cada parásito localizado facilita esta tarea.

Debe registrarse el número del campo en el que se encuentra el primer parásito. El examinador, con los ojos fijos en el parásito en el centro del campo, comprueba primero si el portaobjetos está firmemente apoyado en el carro mecánico. Si no hay firmeza, se corrige la posición del portaobjetos sin perder de vista el objeto

que ha de marcarse con un círculo. Por último, cuando el portaobjetos se ha fijado firmemente, el examinador se vale del marcador para dibujar un círculo alrededor del objeto, primero uno pequeño y luego uno más grande para facilitar su reconocimiento.

Si, por ejemplo, el primer parásito se encontró en el campo 37, y se encuentran dos más—uno en el campo 61 y el otro en el 93—los resultados se registran como 37, 61, 93 $\frac{\circ}{\circ}$. Las tres pequeñas letras "o", colocadas verticalmente después de estas cifras, indican que se han encerrado tres parásitos con un círculo y que éstos pueden localizarse con el objetivo de 10x.

Una vez que se hayan observado tres parásitos, fidedignos, el examinador debe encontrar un número suficiente de parásitos para determinar con exactitud las especies, independientemente del número de campos. Si, después de examinar 300 campos, no le es posible establecer un diagnóstico, por haber encontrado solamente siete parásitos, debe estar autorizado a colocar un signo de interrogación después del diagnóstico más probable, por ejemplo, F?— o a escribir simplemente 7p/300 $\frac{\circ}{\circ}$ F, dando así al revisor una idea precisa acerca de la frecuencia de los parásitos. En una ocasión en que se marcó con un círculo un parásito bien desarrollado, no se encontraron otros a pesar de haberse examinado 2.000 campos más.

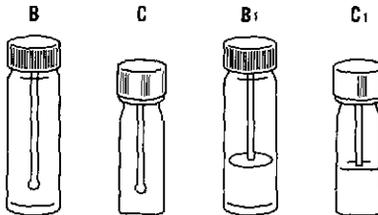
Apéndice 17

ACEITE DE INMERSION

El pequeño dibujo A representa una sección transversal de un objetivo de inmersión en aceite dispuesto de manera que se vean los seis distintos elementos ópticos de que consta. El primero, del tamaño de una cabeza de alfiler, es el que con mayor frecuencia y facilidad se daña como consecuencia de golpes externos. Se verá que esta pequeña lente es esférica y tiene una distancia focal muy pequeña. El aumento con un objetivo de 90–100x es tan grande que no puede lograrse la resolución adecuada si no se conecta la parte superior del portaobjetos que contiene la muestra de sangre con el objetivo mediante una capa conveniente de aceite que tenga el mismo índice de refracción que el cristal.



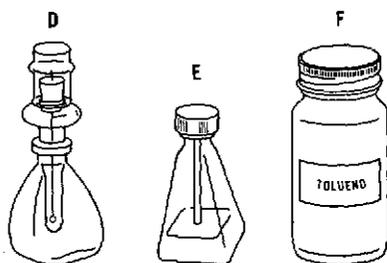
Los dibujos B y C muestran dos tipos de botellas de ensayo para aceite de inmersión, con extremos esferoidales en los aplicadores de cristal para facilitar la aplicación de la cantidad de aceite necesaria. En estos dibujos pueden verse claramente los extremos por estar rodeados de aire. En los dibujos B1 y C1 se ve que los extremos han desaparecido al sumergirlos en aceite con un índice de refracción conveniente.



Como existen varios aceites sintéticos modernos de inmersión, ya no es necesario usar el aceite de cedro tradicional. Este aceite se vuelve viscoso rápidamente y se seca como barniz, reteniendo cualquier partícula de arena o arenilla con la que entre en contacto. A ello se debía en gran medida el desgaste de la parte inferior del carro mecánico. Además, por su viscosidad, era difícil quitar el aceite de cedro del portaobjetos después del examen.

El dibujo D muestra un frasco de tipo antiguo de aceite xileno que todavía es usado (el frasco piramidal, dibujo E, es mejor). El

estrecho tubo interior contenía aceite de cedro, que se extraía con un alambre fino terminado en asa; o una o dos gotas de xileno se recogían al final del tubo interior y se aplicaban al objetivo para facilitar la remoción del aceite pegajoso. Este frasco dificulta la rápida manipulación de los portaobjetos y, por lo tanto, se ha reemplazado como botella de trabajo por frascos como los del tipo B y C, que tienen un sencillo tapón en rosca de boca ancha, y del tipo F, que contiene el tolueno, fluido y más volátil, en el que puede sumergirse el portaobjetos después de haberse eliminado primero la mayor parte del aceite mediante un papel fino tipo "Kleenex" u otra clase de papel absorbente.



Hay varios aceites sintéticos modernos como el Crown, Mersol, algunos aceites sintéticos de cedro y el aceite Cargille o Shillaber que viene en dos densidades. Generalmente, los aceites espesos disminuyen la velocidad con que se realiza el trabajo. El anisol o el benzoato metílico, un solvente graso, se ha usado porque tiene un índice de refracción adecuado y no es volátil. Si no descolora los frotis y si no molesta su olor, puede ensayarse, pero no se recomienda su empleo.

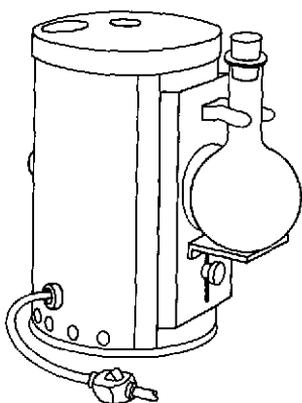
Para preparar un aceite de inmersión delgado y satisfactorio se mezclan los siguientes ingredientes:

Petrolado líquido USP o BP (espeso) o (Nujol)	82 partes
1-bromonaftaleno	18 partes

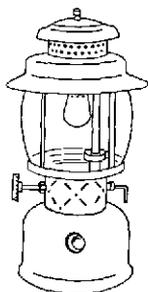
El 1-bromonaftaleno puede obtenerse de Matheson, Coleman and Bell, East Rutherford, New Jersey, E.U.A.

Para cerciorarse de que no ha quedado aceite en el portaobjetos después de la inmersión en tolueno, se coloca un pedazo de "Kleenex" ligeramente por encima de la gota gruesa de sangre mientras esté todavía mojada con el tolueno.

Apéndice 18
TIPOS DE LAMPARAS DE MICROSCOPIO

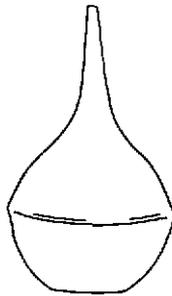


Lámpara de microscopio descrita en el catálogo A.H.T. N° 6958-E.



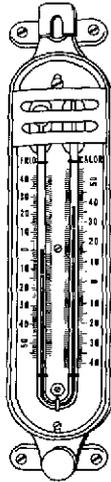
Tipo de lámpara a presión que puede usarse en los lugares donde no haya electricidad, siempre que sea de 250 bujías o menos. El calor es intolerable con bujías de mayor potencia.

Apéndice 19
PERA DE GOMA



Esta pera de goma, con capacidad para 120 cc, puede producir un fuerte soplo de aire. Es útil para eliminar pelusas, hilachas de papel y polvo seco de las superficies de las lentes y prismas del microscopio.

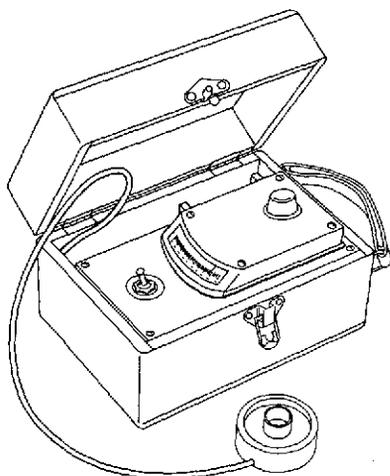
Apéndice 20
TERMOMETRO DE MAXIMA Y MINIMA



La lectura del termómetro de máxima y mínima no requiere explicación. Los indicadores que muestran el punto más alto alcanzado por las columnas de mercurio pueden ponerse en contacto con éste, mediante el pequeño imán que se observa en la parte superior.

Apéndice 21

FOTOMETRO "PHOTOVOLT"



El modelo M-200 de la Photovolt Corporation, 95 Madison Ave., New York 16, N. Y., tiene una delicada célula fotoeléctrica que, con el puntero colocado en HI, registra fracciones de una bujía/pie en una escala en que 100 divisiones son iguales a 2 bujías/pie. La lectura puede registrarse en bujías/pie o, más sencillamente, como el número de las divisiones que la aguja indica. Es ventajoso colocar el nivel "cero" en el área 20 ó 30 de la escala, donde la aguja se mueve más libremente. Un aparato especial que se adapte a cualquier ocular permite medir la luz al nivel de los ojos. La lectura en tales condiciones enseña una división más baja por término medio que en los casos en que no se utiliza el aparato.

La cantidad de luz en un microscopio binocular, establecida por un microscopista corriente, varía entre 1,5 y 4 divisiones. Generalmente se puede mejorar la lectura en cuatro divisiones ajustando debidamente todos los factores pertinentes.

Por lo general, los estudiantes procuran obtener una lectura numérica más elevada que sus colegas. Cuando lo logran, mejoran su propia iluminación.

Apéndice 22

INSPECCION CONTINUA DEL EQUIPO DE MICROSCOPIA

La experiencia demuestra que la única manera de mantener totalmente limpios los microscopios que se han de utilizar en todo programa de erradicación de la malaria de cualquier país consiste en someterlos a inspección continua cada dos o tres meses y en confiar esta labor a una persona *competente*.

Esta persona debe tener, sobre todo, un gran interés tanto por la microscopia como por la calidad de las gotas gruesas de sangre. Para efectuar la inspección debe disponer del siguiente equipo:

Un objetivo de inmersión en aceite, de repuesto, en perfectas condiciones, a fin de poder compararlo con la lente de inmersión en aceite que ha de examinar.

Una selección de gotas gruesas de sangre bien preparadas y bien coloreadas para usarlas como portaobjetos de prueba y demostración.

Varios pares de oculares de 5x, 6x, etc., que permitan lograr una ampliación total de 6-800x con las distintas marcas de microscopios que se usen en la región de que se trate.

1 lente manual de 5x.

1 pera de goma, de 120 cc de capacidad.

1 tubo de vaselina.

2 hojas de papel esmerilado N° 00 ó 000.

1 juego de destornilladores de distintos tamaños.

1 juego de destornilladores, de los que utilizan los dentistas o los relojeros.

1 par de alicates pequeños ordinarios; quizá un par de alicates de punta de aguja.

50 gm de algodón absorbente muy fino.

24 aplicadores de madera.

1 medidor de luz "Photovolt" (útil, pero no indispensable).

Apéndice 23

DEFINICIONES

<i>Trofozoitos</i>	Todos los parásitos no divididos. Los trofozoitos más jóvenes se llaman "anillos".
<i>Esquizontos</i>	Todas las formas <i>adultas</i> asexuales con dos o más divisiones del núcleo.
<i>Esquizontos maduros</i>	Esquizontos en que los merozoitos están completamente formados.
<i>Merozoitos</i>	Producto de la segmentación de un esquizonto hepático o de un esquizonto eritrocítico. Pueden estar separados del esquizonto original o contenidos en él.
<i>Fase eritrocítica</i>	Cualquier fase del parásito dentro de los glóbulos rojos.
<i>Fase exoeritrocítica</i>	Fase hepática en el hombre. Pre-eritrocítica cuando se deriva de los esporozoitos (la única fase que se forma en las infecciones por <i>P. falciparum</i>); exoeritrocítica, si se deriva de otras fases hepáticas.
<i>Gametocitos</i>	Formas sexuales que se desarrollan y maduran mientras están todavía en el mismo glóbulo rojo. Los gametocitos del <i>P. falciparum</i> se denominan comúnmente "medias lunas" o "banano".
<i>Esporozoito</i>	Formas infectivas para el hombre que resultan de la última división del ooquiste en el mosquito.
<i>Ooquiste</i>	Se desarrolla del gameto fertilizado entre las células de revestimiento del estómago del mosquito.
<i>Hematina</i>	El <i>pigmento</i> que se encuentra en todas las formas del parásito, menos en las iniciales; se podría llamar también hemazoína.
<i>Cromatina</i>	El material nuclear coloreado rojo del parásito.
<i>Citoplasma</i>	El protoplasma teñido azulado del parásito.

DEFINICIONES (cont.)

- Periodo de incubación* El tiempo que transcurre entre la picadura del mosquito infectivo y la aparición de parásitos o síntomas. Comprende la duración de la fase pre-eritrocítica, más el número de días necesarios para que los parásitos alcancen niveles microscópicos o produzcan síntomas.
- Paroxismo* Las manifestaciones cíclicas que siguen a la esquizogonia de un número elevado de parásitos de cualquier especie. Las más comunes son los escalofríos y la fiebre. Un paroxismo puede durar de $\frac{1}{2}$ a 18 horas.
- Ataque* Puede comprender uno o varios paroxismos y terminar espontáneamente o después de haberse administrado la medicina; puede durar uno o varios días.
- Anemia* La pérdida de glóbulos rojos por cualquier causa. En el caso de la malaria, resulta de la ruptura de los esquizontos maduros en el momento de cada esquizogonia. Barber fue el primero en observar el aumento del número de elementos eritrocíticos teñidos de azul en una gota gruesa de sangre, como indicación de anemia.
-