



MICROPRUEBA IN VITRO (MARK II) PARA LA EVALUACION DE LA RESPUESTA DEL PLASMODIUM FALCIPARUM
A LA CLOROQUINA, LA MEFLOQUINA, LA QUININA, LA SULFADOXINA/PIRIMETAMINA Y LA AMODIAQUINA

Instrucciones para el empleo del estuche de micropruebas in vitro (Mark II)
y para rellenar el formulario con los resultados

INDICE

	<u>Página</u>
PARTE A. INSTRUCCIONES PARA EL EMPLEO DEL ESTUCHE DE MICROPRUEBAS <u>IN VITRO</u> (MARK II) ..	3
1. Contenido del estuche de micropruebas	3
1.1 Estuche de micropruebas A (estuche básico)	3
1.2 Estuche de micropruebas B (repuestos)	4
2. Notas importantes	4
3. Disposición de las placas de microcultivo	5
3.1 Cloroquina (CL)	5
3.2 Mefloquina (MEF)	6
3.3 Quinina (QNN)	6
3.4 Sulfadoxina/pirimetamina (SDX/PIR)	6
3.5 Amodiaquina (AMO)	7
4. Procedimientos	7
4.1 Evaluación previa de los sujetos sometidos a las pruebas	7
4.2 Preparación del medio de cultivo	7
4.3 Realización de la microprueba Mark II	8
5. Examen del frotis de sangre después del cultivo	10
5.1 Advertencia previa	10
5.2 Procedimiento de recuento para las preparaciones en gota gruesa después del cultivo con CL, MEF, QNN y AMO	10
5.3 Procedimiento de recuento para las preparaciones en gota gruesa después del cultivo con SDX/PIR	11

This document is not issued to the general public, and all rights are reserved by the World Health Organization (WHO). The document may not be reviewed, abstracted, quoted, reproduced or translated, in part or in whole, without the prior written permission of WHO. No part of this document may be stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means - electronic, mechanical or other without the prior written permission of WHO.

The views expressed in documents by named authors are solely the responsibility of those authors.

Ce document n'est pas destiné à être distribué au grand public et tous les droits y afférents sont réservés par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS). Il ne peut être commenté, résumé, cité, reproduit ou traduit, partiellement ou en totalité, sans une autorisation préalable écrite de l'OMS. Aucune partie ne doit être chargée dans un système de recherche documentaire ou diffusée sous quelque forme ou par quelque moyen que ce soit - électronique, mécanique, ou autre - sans une autorisation préalable écrite de l'OMS.

Les opinions exprimées dans les documents par des auteurs cités nommément n'engagent que lesdits auteurs.

	<u>Página</u>
6. Interpretación y comunicación de los resultados de las pruebas	12
6.1 Pruebas con CL, MEF, QNN y AMO	12
6.2 Pruebas con SDX/PIR	13
PARTE B. INSTRUCCIONES PARA RELLENAR EL FORMULARIO CON LOS RESULTADOS DE LAS MICRO- PRUEBAS <u>IN VITRO</u> (MARK II)	14
1. Introducción	14
2. Consideraciones generales sobre la manera de rellenar el formulario	14
3. Instrucciones para rellenar el formulario, sección por sección	15
3.1 Sección A: PAIS Y LUGAR DE LA PRUEBA	15
3.2 Sección B: PAIS Y LUGAR DONDE PROBABLEMENTE CONTRAJO LA INFECCION	15
3.3 Sección C: TOMA DE SANGRE	16
3.4 Sección D: INCUBACION	16
3.5 Sección E: PACIENTE	16
3.6 Sección F: MOTIVOS DEL EXAMEN	16
3.7 Sección G: MUESTRA	16
3.8 Sección H: MEDICAMENTO ADMINISTRADO EN LAS DOS ULTIMAS SEMANAS	16
3.9 Sección I: EXAMEN ANTES DEL CULTIVO	17
3.10 Sección J: RESULTADO DE LA MACROPRUEBA	17
3.11 Sección K: RESULTADO DE LA MICROPRUEBA	17
3.12 Sección L: COMPROBACION DE LOS FROTIS	18
3.13 Sección M: DESPLAZAMIENTOS DEL PACIENTE	18
3.14 Sección N: CONCLUSIONES	18
Formulario para anotar los resultados de la microprueba Mark II "Respuesta de <u>P. falciparum</u> a la cloroquina, la mefloquina, la quinina, la SDX/PIR y la amodiaquina (prueba <u>in vitro</u>)"	19
Fig. 1	20
Anexo 1. Lista de países o territorios, por regiones	21

PARTE A. INSTRUCCIONES PARA EL EMPLEO DEL ESTUCHE DE MICROPRUEBAS IN VITRO (MARK II)

1. CONTENIDO DEL ESTUCHE DE MICROPRUEBAS

1.1 <u>Estuche de micropruebas A (estuche básico)</u>	<u>Cantidad</u>
Placa de cultivo de tejidos, 12 x 8 pocillos, predosificados con:	12
cloroquina: 1 - 64 pmol por pocillo	
mefloquina: 2 - 128 pmol por pocillo	
quinina: 4 - 256 pmol por pocillo	
sulfadoxina/pirimetamina (SDX/PIR):	
10 - 10 000 pmol SDX : 0,125 - 125 pmol PIR por pocillo	
amodiaquina: 0,25 - 16 pmol por pocillo	
NOTA: 12 placas en cualquier combinación de 5 tipos de placas si es necesario.	
Pipeta de Eppendorf, 50 µl	1
Punta de pipeta de Eppendorf estéril	100
Frasco con RPMI 1640 LPLF, estéril, 100 ml	2
Frasco con L-glutamina liofilizada, estéril, para 10 ml	20
Tubo Falcon, con tapón de presión, 6 ml	100
Jeringuilla desechable, estéril, 20 ml	20
Aguja de 1 1/2" x 20 G, estéril	20
Portaobjetos, borde esmerilado (caja de 72 ó 50)	2
Mango de bisturí	1
Hoja de bisturí	5
Pinzas	1
Hojas de aluminio (rollo de 30 m x 30 cm)	1
Tubo capilar, tratado con heparina, estéril, 100 µl (tubo de 20)	5
Gradilla, alambre cubierto de plástico	1
Etiqueta, redonda (hoja de 77)	2
Torunda	50
Pipeta, estéril, 1 ml	20
Tubo capilar, no tratado, no estéril, 50 µl	500
Boquilla para tubo capilar	2
Pera para tubo capilar	2
Lanceta automática	1
Cuchilla para lanceta	100
Soporte para lanceta	100
Lápiz graso	1
Vela, parafina pura	2
Tampón para el frasco de tinción con polvo suficiente para 1 litro de solución	5
Colorante A de Romanovsky, cuentagotas de plástico, 60 ml	1
Colorante B de Romanovsky, cuentagotas de plástico, 60 ml	1
Placa de tinción curva	1
Instrucciones para el empleo del estuche de micropruebas Mark II	3
Juego de fichas para el estuche de micropruebas Mark II	50

	<u>Cantidad</u>
Fotografías de parásitos (<u>Plasmodium falciparum</u>) antes y después del cultivo	4
Grasa, silicona, para tarro de vela (tubo)	1
Guantes de protección, lavables, tamaño mediano/grande (20 pares de cada tamaño)	40
1.2 <u>Estuche de micropruebas B (repuestos)</u>	
Placa de cultivo de tejidos, 12 x 8 pocillos, predosificados con:	6
cloroquina: 1 - 64 pmol por pocillo	
mefloquina: 2 - 128 pmol por pocillo	
quinina: 4 - 256 pmol por pocillo	
sulfaodoxina/pirimetamina:	
10 - 10 000 pmol SDX : 0,125 - 125 pmol PIR por pocillo	
amodiaquina: 0,25 - 16 pmol por pocillo	
NOTA: 6 placas en la combinación de 5 tipos de placas que pueda necesitarse.	
Punta de pipeta de Eppendorf, estéril	50
Frasco con RPMI 1640 LPLF, estéril, 100 ml	1
Frasco con L-glutamina liofilizada, estéril, para 10 ml	10
Tubo Falcon, tapón de presión, 6 ml	50
Jeringuilla desechable, estéril, 20 ml	10
Aguja de 1 1/2" x 20 G, estéril	10
Portaobjetos, borde esmerilado (caja de 72 ó 50)	1
Hoja de bisturí	2
Tubo capilar, tratado con heparina, estéril, 100 µl (tubo de 20)	3
Etiqueta, redonda (hoja de 77)	1
Torunda	25
Pipeta, estéril, 1 ml	10
Tubo capilar, no tratado, no estéril, 50 µl	250
Pera para tubo capilar	2
Cuchilla para la lanceta	50
Soporte para la lanceta	50
Lápiz graso	1
Vela, parafina pura	2
Tampón para el frasco de tinción con polvo suficiente para 1 litro de solución	2
Colorante A de Romanovsky, cuentagotas de plástico, 60 ml	1
Colorante B de Romanovsky, cuentagotas de plástico, 60 ml	1
Instrucciones para el empleo del estuche de micropruebas Mark II	1
Juego de fichas para el estuche de micropruebas Mark II	25
Guantes de protección, lavables, tamaño mediano/grande (10 pares de cada tamaño)	20

2. NOTAS IMPORTANTES

2.1 Todo el material que se suministra con este estuche de micropruebas y que se utiliza para manipular sangre humana es desechable.

En vista del peligro que entraña este material para las personas no informadas, habrá que poner sumo cuidado en eliminarlo adecuadamente después de su empleo.

El modo correcto de proceder se indica en el documento "Biosafety in in vivo and in vitro studies of human malaria", por David Payne (WHO/MAL/83.1000, disponible sólo en inglés y en francés).

EN NINGUNA CIRCUNSTANCIA SE DEBE VOLVER A UTILIZAR EL MATERIAL DESECHABLE.

2.2 Al seleccionar el material utilizado en los estuches de micropruebas in vitro (Mark II) normalizadas de la OMS se ha hecho todo lo posible para especificar el material cuyo plazo máximo de conservación es largo - o indefinido - a temperaturas ambiente normales.

Sin embargo, algunos componentes del estuche se conservan durante un plazo limitado, que es muy corto incluso para variaciones normales de la temperatura ambiente. En consecuencia, los dos elementos que se indican a continuación siempre deberán almacenarse a +4 °C (temperatura normal de una refrigeradora) y transportarse a esta temperatura siempre que sea posible:

- medio líquido RPMI 1640 LPLF (conservación máxima 2 años);
- viales de L-glutamina (conservación máxima 2 años).

Siempre que sea posible, las placas de prueba predosificadas (conservación máxima 3 años) también se almacenarán a +4 °C.

NO METER NINGUNO DE LOS COMPONENTES EN EL CONGELADOR.

2.3 El recipiente más cómodo para transportar material sensible es un termo o una nevera portátil que contenga bloques de refrigeración en cantidad adecuada. Si se emplea hielo, éste deberá ir encerrado en bolsas impermeables.

Evítese siempre el contacto directo del material de prueba con el refrigerante.

2.4 Una vez recibidos del suministrador los estuches de micropruebas hay que separar inmediatamente los componentes cuyo plazo de conservación sea limitado y almacenarlos adecuadamente.

3. DISPOSICION DE LAS PLACAS DE MICROCULTIVO

3.1 Cloroquina (CL)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	pmol/pocillo
B	1												
C	2												
D	4												
E	8												
F	16												
G	32												
H	64												

El pocillo A es el testigo.

Los pocillos B - H representan una línea de concentración de cloroquina basada en una progresión geométrica de 2⁰; 2¹; 2²; 2³; 2⁴; 2⁵; y 2⁶.

3.2 Mefloquina (MEF)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	pmol/pocillo
B	2												
C	4												
D	8												
E	16												
F	32												
G	64												
H	128												

El pocillo A es el testigo.

Los pocillos B - H representan una línea de concentración de mefloquina basada en una progresión geométrica de 2^1 ; 2^2 ; 2^3 ; 2^4 ; 2^5 ; 2^6 ; y 2^7 .

3.3 Quinina (QNN)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	pmol/pocillo
B	4												
C	8												
D	16												
E	32												
F	64												
G	128												
H	256												

El pocillo A es el testigo.

Los pocillos B - H representan una línea de concentración de quinina basada en una progresión geométrica de 2^2 ; 2^3 ; 2^4 ; 2^5 ; 2^6 ; 2^7 ; y 2^8 .

3.4 Sulfadoxina/pirimetamina (SDX/PIR)

Coefficiente 80:1. Se indica la dosis para la SDX.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	pmol/pocillo
B	10												
C	30												
D	100												
E	300												
F	1 000												
G	3 000												
H	10 000												

El pocillo A es el testigo.

Los pocillos B - H representan una línea de concentración de SDX/PIR basada en una progresión geométrica de factores 3 y 3,33 (alternándose) y base 10.

3.5 Amodiaquina (AMO)

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	pmol/pocillo
B	0,25												
C	0,50												
D	1,00												
E	2,00												
F	4,00												
G	8,00												
H	16,00												

El pocillo A es el testigo.

Los pocillos B - H representan una línea de concentración de amodiaquina basada en una progresión geométrica de 2^{-2} ; 2^{-1} ; 2^0 ; 2^1 ; 2^2 ; 2^3 ; y 2^4 .

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 Evaluación previa de los sujetos sometidos a las pruebas

4.1.1 Deben ser excluidas de la prueba las personas que han recibido quinina en los últimos 7 días, 4-aminoquinoleínas en los últimos 14 días, pirimetamina y/o sulfamidas en los últimos 28 días, o mefloquina en los últimos 63 días. Es de esperar que con los análisis de orina que se están preparando actualmente se mejore la especificidad y sensibilidad de los procedimientos de análisis para los antipalúdicos corrientes. Cabe señalar que la prueba Dill-Glazko normalizada que se utiliza para las 4-aminoquinoleínas da también un resultado positivo con la mefloquina y la quinina. Pero en ambos casos el color producido es un color más naranja que rojo (color coñac) y sólo aparecerá cuando el paciente haya tomado esos medicamentos en las pocas horas que preceden, o se halla aún en tratamiento con ellos.

4.1.2 Se debe obtener el consentimiento escrito o verbal, según convenga, de todos los sujetos de quienes se toman muestras de sangre para su análisis.

4.1.3 Se toma sangre para extensiones y preparaciones en gota gruesa de personas que se sospecha que tienen paludismo, y se tiñen las preparaciones por el método de Giemsa u otro colorante fiable, como el de Romanovsky. Se consideran aptos para el análisis los pacientes que tienen infecciones simples por P. falciparum y parasitemias con más de 1000 formas asexuadas del parásito, pero menos de 80 000. Estos pacientes preseleccionados deben someterse a un análisis de orina en busca de 4-aminoquinoleínas y sulfadoxina, descartándose a los que arrojen resultados positivos.

4.1.4 Los datos biológicos y otros datos de interés sobre cada paciente se anotan en la ficha elaborada por la OMS para la microprueba Mark II, "Respuesta de P. falciparum a la cloroquina, mefloquina, quinina, SDX/PIR y amodiaquina (prueba in vitro)", de la que se facilita un surtido, junto con instrucciones detalladas, en cada estuche de micropruebas, y se van rellenando las partes correspondientes de la ficha conforme se desarrolla la prueba. Se adjunta un modelo de la ficha.

4.2 Preparación del medio de cultivo

a) Tómese del estuche de análisis o de la refrigeradora lo siguiente:

- 1 frasco de 100 ml de medio líquido RPM1 1640 LPLF;
- 1 o más viales de L-glutamina (un vial por cada 20 líneas de prueba);
- Torundas (para esterilizar con alcohol los tapones de caucho del frasco de medio líquido y el vial o los viales de L-glutamina);
- 1 jeringuilla, 20 ml;

- 2 agujas para las jeringuillas;
- 1 o más tubos Falcon, 6 ml;
- 1 gradilla para tubos de plástico;
- 1 o más pipetas graduadas, estériles, de 1 ml (1 pipeta por cada vial de L-glutamina).

b) Tómese la jeringuilla de 20 ml y dos agujas, teniendo cuidado de mantenerlas estériles, pues no hay ninguna fase de filtración en esta prueba. Límpiase el cierre de caucho del frasco que contiene medio líquido LPLF frotándolo con una torunda empapada de alcohol, déjese secar y perfórese el cierre con una aguja. Móntese la otra aguja en la jeringuilla de 20 ml.

c) Sáquense 10 ml de medio líquido de LPLF del frasco de 100 ml. Tápese de nuevo la aguja y colóquese la jeringuilla en un lugar seguro.

d) Retírese la aguja perforadora y después de limpiar el cierre de caucho del vial de L-glutamina con una torunda empapada de alcohol y una vez seco el cierre, utilícese esa misma aguja para perforar el cierre del vial de L-glutamina.

e) Destápese la aguja de la jeringuilla de 20 ml e introdúzcanse los 10 ml del medio líquido LPLF en el vial de L-glutamina. Agítese todo suavemente para disolver la L-glutamina. Retírese y tápese de nuevo la aguja perforadora. Tápese también de nuevo la aguja de la jeringuilla de 20 ml y guárdense las dos en un lugar seguro por si se necesitan más tarde (véase párrafo g)).

f) Quítese la tapa de aluminio y el cierre de caucho del vial de L-glutamina (teniendo cuidado de mantenerlo estéril) y, usando una pipeta graduada de 1 ml, pónganse 0,9 ml de L-glutamina, más medio LPLF, en tantos tubos Falcon de 6 ml con tapón de presión como pacientes por analizar. Pónganse etiquetas en los tubos, marcando en ellas el número de serie del paciente analizado y déjense plantados los tubos verticalmente en la gradilla.

g) De necesitarse más tubos, se puede adoptar el mismo proceso de preparación con las mismas jeringuillas y agujas antes usadas.

h) Almacénese de nuevo en un lugar refrigerado el frasco de 100 ml de medio líquido LPLF parcialmente utilizado y deséchense las jeringuillas y agujas usadas de acuerdo con el documento "Biosafety in in vivo and in vitro studies of human malaria", por David Payne (WHO/MAL/83.1000; disponible sólo en inglés y en francés).

i) Los tubos Falcon de 6 ml que contienen 0,9 ml de medio líquido LPLF se pueden almacenar en una refrigeradora por un plazo máximo de 48 horas antes de su uso o transportarse sobre el terreno en un termo que contenga cubos de hielo o bloques refrigerantes. Hay que procurar, sin embargo, que los tubos no entren en contacto directo con los bloques de hielo y no se inviertan o se sumerjan en agua, pues esto podría dar lugar a contaminación durante la incubación.

NOTA: Cuando no se pueda efectuar la prueba in vitro sobre el terreno o cuando sea necesario transportar la sangre del paciente (o de los pacientes) durante una larga distancia, la sangre de cada paciente se debe colocar en el medio LPLF (véase el párrafo 4.3.1) y transportar en un termo que contenga cubos de hielo o bloques refrigerantes. Hay que evitar que los tubos entren en contacto directo con el refrigerante, dada la posibilidad de lisis por choque (rotura espontánea de los glóbulos rojos). Esto puede evitarse envolviendo los tubos en algodón en rama o espuma de plástico. El refrigerante más eficaz es el hielo húmedo: mezcla de hielo machacado y agua a partes iguales. Cuando se use este procedimiento se procurará proteger los tubos del contacto directo con el agua, para evitar toda contaminación. Cerrando los tubos primero en una bolsa de plástico y envolviendo ésta luego en algodón en rama o en espuma de plástico se evita normalmente todo problema de contaminación por el hielo húmedo.

4.3 Realización de la microprueba Mark II

4.3.1 Con la lanceta automática, púncese el dedo del paciente para aspirar 100 µl de sangre en un tubo capilar estéril tratado con heparina. Traspásese rápidamente la sangre a un tubo Falcon de plástico de 6 ml que contenga 0,9 ml de medio líquido LPLF (véase la sección 4.2 f)) y póngasele una etiqueta debidamente marcada con el número de serie del sujeto que va a analizarse. Círrrese el tubo con el tapón apretándolo bien y agítese para mezclar la sangre con el medio. El traspaso de la sangre del tubo capilar heparinizado al tubo de 6 ml que contiene el

medio se efectúa utilizando la pequeña pera negra de plástico de 1 ml suministrada con el estuche. Antes de utilizar el tubo capilar de 100 μ l para recoger la sangre, se introduce su extremo distal en la pera y, tapando el orificio situado en el extremo de ésta con la yema del dedo y haciendo una ligera presión en la pera, se propulsa sin dificultad la sangre contenida en el tubo capilar hacia el tubo que contiene el medio.

4.3.2 Háganse las extensiones y preparaciones en gota gruesa previas al cultivo.

4.3.3 La mezcla sangre/medio se mantiene estable varias horas y los tubos pueden transportarse en el bolsillo del pecho para mantener el contenido a una temperatura aproximadamente igual a la corporal. Si se prevé un tiempo de transporte superior a 4 horas, conviene adoptar la técnica de hielo húmedo descrita en la NOTA que figura al final de la sección 4.2. Una temperatura ambiente de más de 40 °C destruirá a los parásitos.

4.3.4 Se quitan las tiras de plástico de precintado del número necesario de pocillos en la placa o placas apropiadas, cortando primero a lo largo de las filas correspondientes con un escalpelo y levantando luego con pinzas el área de plástico necesaria teniendo cuidado de no contaminar los pocillos.

4.3.5 Todos los pocillos de la fila apropiada (una fila por cada sujeto analizado) se dosifican con 50 μ l de la mezcla sangre/medio (1:9) usando la pipeta de Eppendorf de 50 μ l y una punta estéril desechable suministrada con el estuche. La dosificación se efectúa siempre empezando por el pocillo testigo (A) y siguiendo luego por orden creciente de concentración hasta el pocillo H. Es sumamente importante agitar de vez en cuando la mezcla sangre/medio en el tubo de 6 ml para asegurarse de que la sangre se mantiene en suspensión y se distribuye así por igual a todos los pocillos. Luego se quita y se tira la punta desechable estéril.

4.3.6 Se adapta una nueva punta desechable estéril a la pipeta de Eppendorf y se instala la próxima fila exactamente del mismo modo, y así sucesivamente hasta que todas las muestras quedan repartidas en partes alícuotas sobre la placa o placas.

4.3.7 Se coloca la cubierta sobre la microplaca y con un lápiz graso se escriben los detalles de cada sujeto analizado sobre la fila correspondiente de la placa.

4.3.8 Agítese la placa suavemente para tener la seguridad de que el fármaco depositado en los pocillos ha quedado completamente disuelto.

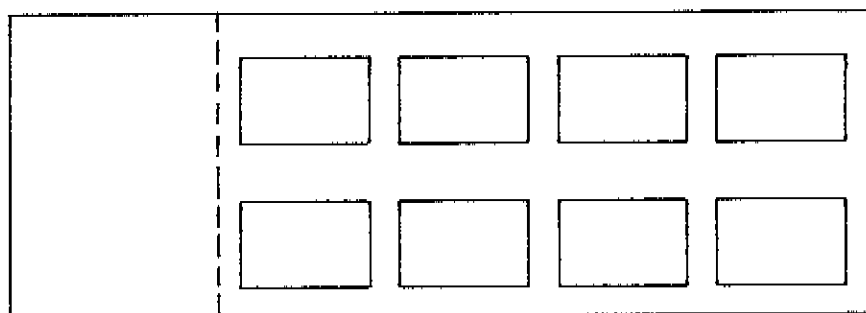
4.3.9 Se toma el tarro de velas de la incubadora (regulada para asegurar una temperatura interna de 37,5 °C en el tarro; es sumamente importante precalentarlo durante una hora como mínimo) y se carga con las placas que van a incubarse. Se encienden dos velas (sólo deben usarse las velas de parafina pura suministradas con el estuche) y se coloca una a cada lado de la pila de placas. Evítese poner las velas encima de las placas. Póngase la cubierta en el tarro de velas sellándolo bien, pero con el grifo de evacuación en posición abierta. Cuando la segunda vela esté a punto de apagarse, ciérrese el grifo de evacuación.

4.3.10 Se coloca el tarro de velas en la incubadora y se anota la hora.

4.3.11 Se incuba el contenido a 37,5 °C (\pm 0,5 °C) durante 24-30 horas (según la fase de desarrollo de los trofozoítos en el frotis previo al cultivo). Según la experiencia acumulada hasta la fecha, los cultivos aislados que no han producido esquizontes dentro de un plazo de 30 horas están influidos por factores que invalidan el procedimiento de análisis. Hasta ahora, el retraso de maduración de esquizontes ha obedecido casi siempre a la ingestión previa de anti-palúdicos por el sujeto analizado.

4.3.12 Tras la incubación se cosecha el contenido de los pocillos quitando el líquido que sobrenada con tubos capilares de 50 μ l (y la pera de caucho negro para aspirar) y se traspasan los glóbulos rojos depositados en el fondo plano de los pocillos a un portaobjetos limpio, para formar una serie de gotas gruesas dispuestas de la forma aquí indicada:

POCILLO A POCILLO B POCILLO C POCILLO D



POCILLO E POCILLO F POCILLO G POCILLO H

Debe utilizarse un nuevo tubo capilar para cada gota gruesa.

4.3.13 Antes de teñirlas, hay que secar cuidadosamente las preparaciones en gota gruesa resultantes, pues de otro modo se desprenderán espontáneamente del portaobjetos. Normalmente se necesitan 24-48 horas para secarlas al aire, pero este plazo puede acortarse secándolas en una estufa a 37,5 °C (30 minutos) o con un secador de pelo. En este caso conviene tener cuidado de no sobrecalentar las preparaciones, para que no se fijen.

Algunos trabajadores han obtenido resultados sumamente satisfactorios con frotis tratados con acetona. Se exponen las preparaciones al aire hasta que estén visiblemente secas, lo cual suele ocurrir antes de 30 minutos. Luego se sumerge el portaobjetos en acetona pura, se seca al aire y se tiñe del modo expuesto a continuación.

4.3.14 Las preparaciones en gota gruesa se tiñen durante 30 minutos con Giemsa de calidad superior diluido al 1% (v/v) en agua de 7,2 de pH. Hay que tener sumo cuidado al manipular las preparaciones teñidas mientras no estén completamente secas.

El secado puede efectuarse al aire libre, en una estufa (37,5 °C) o con un secador de pelo, pero en este último caso cuidando de no sobrecalentar y degradar el colorante.

5. EXAMEN DEL FROTIS DE SANGRE DESPUES DEL CULTIVO

5.1 Advertencia previa

Es sumamente importante percatarse de que el modo de proceder para el recuento de esquizontes en el caso de la SDX/PIR difiere del procedimiento adoptado para los cuatro otros medicamentos (CL, MEF, QNN y AMO) en el sistema de micropruebas Mark II.

5.2 Procedimiento de recuento para las preparaciones en gota gruesa después del cultivo con CL, MEF, QNN y AMO

La base para el recuento es la siguiente:

NUMERO DE ESQUIZONTES CON TRES O MAS NUCLEOS EN UN TOTAL
DE 200 PARASITOS ASEJUADOS (ESQUIZONTES Y TROFOZOITOS).

Para que la prueba sea aceptable, la proporción de esquizontes maduros debe ser del 10% o más (es decir, 20 esquizontes con tres o más núcleos por 200 parásitos asexuados). Esta cifra puede luego expresarse como porcentaje de la obtenida en el testigo, como en el ejemplo siguiente:

TESTIGOS	MEDICAMENTO SOMETIDO A PRUEBA	
Número de esquizontes, es decir, parásitos con tres o más núcleos por 200 parásitos después de la incubación.	Número de esquizontes. Debe repetirse para cada pocillo.	
Testigos	Número de esquizontes por 200 parásitos después de la incubación	% de esquizontes en relación con las muestras testigo (testigos = 100%)
98	49	$\frac{49}{98} \times 100 = 50\%$

5.3 Procedimiento de recuento para las preparaciones en gota gruesa después del cultivo con SDX/PIR

En la microprueba realizada de la OMS, la acción de la SDX/PIR en el esquizonte en desarrollo no es tan clara como en el caso de la CL, la MEF, la QNN o la AMO. Los esquizontes con tres núcleos o más se desarrollan incluso cuando el fármaco es eficaz, aunque esos núcleos no suelen estar bien definidos y el desarrollo del esquizonte puede aparecer anormal. En consecuencia, la determinación del "punto de ruptura", es decir, el momento en que termina la sensibilidad y empieza la resistencia, resulta más difícil, no pudiéndose utilizar el porcentaje de esquizontes con tres núcleos o más para definir el crecimiento de esquizontes como en el caso de la CL, la MEF, la QNN y la AMO.

Para superar esta dificultad y evitar que no se puedan distinguir claramente los núcleos normales de los anormales, el umbral del crecimiento de esquizontes se ha modificado de 1 a 8 o más núcleos normales. Esto se debe a que los esquizontes que se desarrollan hasta la fase de 8 núcleos o más en presencia de la SDX/PIR no suelen ser anormales, lo cual indica un crecimiento normal (maduración).

Teniendo presente lo antedicho, el recuento en el caso de las preparaciones en gota gruesa con SDX/PIR se basa en tres criterios:

- a) presencia de trofozoítos;
- b) presencia de esquizontes con 3-7 núcleos, y esquizontes anormales;
- c) presencia de esquizontes normales con 8 núcleos o más.

Así pues, los recuentos comparativos de parásitos asexuados utilizando SDX/PIR son algo más complejos que en el caso de la microprueba normalizada de la OMS para CL, MEF, QNN y AMO, pero después de cierta práctica pueden realizarse con relativa facilidad. El procedimiento en el caso de la SDX/PIR es casi igual que en el caso de los otros cuatro fármacos, con la excepción de que es necesario hacer un recuento de los esquizontes con 8 o más núcleos normales por cada 200 parásitos asexuados.

6. INTERPRETACION Y COMUNICACION DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS

Los resultados de las pruebas inmediatamente después de conocerse deben anotarse en la ficha de la OMS "Respuesta de P. falciparum a la cloroquina, mefloquina, quinina, SDX/PIR y amodiaquina", que se ha modificado para adaptarlo a la micropueba in vitro Mark II. Los resultados de esta prueba no pueden consignarse en la primera serie de fichas para pruebas in vitro, dado que las concentraciones de fármaco son diferentes.

Una vez recibida la ficha rellena por la correspondiente oficina regional, los datos se analizan con ordenador y en el momento oportuno se incluyen en el informe periódico del Programa Mundial de Vigilancia. No obstante, el investigador podrá hacer su propio análisis de los datos, ya sea en la forma simplificada de un cuadro, o sirviéndose de la calculadora programable TI 59, elaborando una línea de regresión sobre la base de los análisis probit de la prueba dosis logarítmica/respuesta a partir de la valoración de 3-8 puntos (véase el documento "Evaluation of in vitro tests for drug sensitivity in Plasmodium falciparum: probit analysis of log-dose/response test from 3-8 points assay", por B. Grab y W. H. Wernsdorfer, WHO/MAL/83.990; disponible sólo en inglés y en francés). Los resultados obtenidos con este último tratamiento son muy parecidos a los conseguidos con el ordenador del Programa Mundial de Vigilancia.

6.1 Pruebas con CL, MEF, QNN Y AMO

Siempre que

- a) el procedimiento sea satisfactorio en los testigos (es decir, 20 o más esquizontes con 3 o más núcleos por 200 parásitos asexuados);
- b) el cultivo aislado inicial no contuviera más de 80 000 parásitos por microlitro de sangre, y
- c) la infección fuera realmente debida a P. falciparum únicamente, puede deducirse lo siguiente:

Fármaco probado	Respuesta satisfactoria	Indicación de resistencia
	Inhibición completa de esquizontes a	Crecimiento de esquizontes a
Cloroquina	4 pmol o menos	8 pmol o más
Mefloquina	(*)	64 pmol o más
Quinina	128 pmol o menos	256 pmol o más
Amodiaquina	2 pmol o menos	4 pmol o más

* Concentración crítica aún por determinar (sobre la base de las pruebas comparativas in vivo e in vitro).

Se obtienen datos más significativos cuando se agrupa una serie de pruebas (a ser posible 30 o más, pero 10 como mínimo).

La agrupación de estos datos se consigue fácilmente sumando los recuentos de esquizontes correspondientes a los testigos y a cada concentración y dividiendo el resultado por el número de pruebas a fin de obtener recuentos medios de esquizontes. Estos se transforman en porcentaje de esquizontes en relación con las muestras testigo, como se ha expuesto anteriormente. Ese porcentaje representa los esquizontes maduros. Si se deduce de 100, el resto es el porcentaje de esquizontes cuya maduración ha quedado inhibida.

En el cuadro siguiente se ofrece un ejemplo de esto respecto a una serie de 10 pruebas aceptables con cloroquina:

Número de prueba	Recuentos de esquizontes por pocillo de prueba de:							
	K	1 pmol	2 pmol	4 pmol	8 pmol	16 pmol	32 pmol	64 pmol
1	190	164	81	43	11	2	0	0
2	112	64	32	0	0			
3	178	179	160	138	112	90	40	0
4	196	192	190	186	110	65	23	0
5	49	53	21	11	2	0	0	
6	34	32	30	21	6	1	0	0
7	200	191	111	65	38	11	3	0
8	29	3	1	0	0			
9	128	64	30	16	2	0	0	
10	55	53	47	26	12	0	0	
Total de esquizontes	1 171	995	703	506	293	169	66	0
Número medio de esquizontes	117	100	70	51	29	17	7	0
Porcentaje del testigo	100,0	85,5	59,8	43,6	24,8	14,5	6,0	0
Porcentaje de maduración		85,5	59,8	43,6	24,8	14,5	6,0	0
Porcentaje de inhibición		14,5	40,2	56,4	75,2	85,5	94,0	100,0

Evidentemente, madura todavía un número significativo de esquizontes en los pocillos que contienen 16 y 32 pmol (y en tres de cada diez cultivos aislados se observa maduración de esquizontes a 32 pmol). Como ya se ha visto en el primer cuadro de la presente sección, la maduración de esquizontes en el pocillo de 8 pmol indica resistencia. En ocho de los diez cultivos aislados de este ejemplo se observó maduración de esquizontes en el citado pocillo. Esta serie demuestra una situación de resistencia manifiesta.

La principal ventaja de este sistema estriba en la comparabilidad de los resultados cuantitativos, tanto entre distintas zonas geográficas como entre series de la misma zona en momentos diferentes (estudios longitudinales). Esta clase de vigilancia ofrecerá la posibilidad de advertir con antelación toda reducción importante de la sensibilidad a los fármacos y permitirá a las autoridades sanitarias elaborar políticas farmacéuticas destinadas a retrasar la aparición de resistencia.

6.2 Pruebas con la SDX/PIR

Los recuentos correspondientes a las preparaciones en gota gruesa arrojarán datos como los que se indican en el siguiente ejemplo tabulado:

Parámetro	Pocillo							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Esquizontes con 8 o más núcleos normales	55	56	47	8	0	0	0	0
Otros esquizontes y anillos	145	144	153	192	200	200	200	200
% de maduración de esquizontes (% del testigo)		100	85	15	0	0	0	0
% de inhibición de esquizontes		0	15	85	100	100	100	100

NOTA: Pocillo A = testigo; pocillo B = la más baja concentración de SDX/PIR;
 Pocillo H = la más alta concentración de SDX/PIR.

En este ejemplo, el punto de ruptura se sitúa, por consiguiente, entre el pocillo D (SDX 100 pmol/PIR 1,25 pmol por pocillo) y el pocillo E (SDX 300 pmol/PIR 3,75 pmol por pocillo). Según los datos hasta la fecha disponibles, el 90% de inhibición de los esquizontes con ocho o más núcleos refleja con mayor precisión el punto de ruptura real, punto que puede verificarse con facilidad mediante una simple gráfica, como el de la figura 1 adjunta, usando los datos arriba consignados.

PARTE B. INSTRUCCIONES PARA RELLENAR EL FORMULARIO
 CON LOS RESULTADOS DE LAS MICROPRUEBAS IN VITRO (MARK II)

1. INTRODUCCION

Como en el caso del formulario primitivo, la finalidad de este formulario (véase el modelo adjunto) consiste en permitir, mediante la colaboración del mayor número de centros posible, una vigilancia asistida por ordenador de la respuesta in vitro de P. falciparum a los medicamentos antipalúdicos. La serie de fármacos para las pruebas se ha ampliado y comprende actualmente la cloroquina, la mefloquina, la quinina, la sulfadoxina/pirimetamina (SDX/PIR) y la amodiaquina. El formulario fue elaborado en consulta con numerosos investigadores de muchos países, directamente interesados en el establecimiento y la utilización de pruebas in vitro. Por consiguiente, constituye una solución de compromiso con respecto a la selección de los elementos de información que han de retenerse para el proceso de datos. Es posible, y a todas luces legítimo, que los investigadores deseen reunir otros datos que no están previstos en el formulario. En esos casos, cabe esperar que siga utilizándose el presente formulario y que se registre por separado la información suplementaria.

El formulario se produce automáticamente en cuatro ejemplares, incluido el original. Estos cuatro ejemplares están destinados a: 1) el investigador; 2) OMS/MAP, Ginebra; 3) la Oficina Regional; y 4) una autoridad o institución de carácter nacional. El tratamiento automático de los datos correrá a cargo de la OMS, en Ginebra, al menos al principio.

2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA MANERA DE RELLENAR EL FORMULARIO

El investigador debe rellenar el formulario en el momento de efectuar la prueba (véase el párrafo de introducción a la sección 3). El formulario está concebido para servir de registro primario, es decir, para registrar directamente observaciones sin utilizar ningún registro intermedio o provisional a partir del cual haya que copiar la información (con el trabajo suplementario y los riesgos de error consiguientes).

La información recogida en este registro puede dividirse en dos categorías:

- a) información numérica para tratamiento en ordenador; esta información se incluye en las casillas de datos, numeradas de 1 a 201, y parte de ella es directamente numérica (v.g., el número de esquizontes por 200 parásitos asexuados en una concentración

dada de cloroquina); el resto de esta información no es directamente numérica, pero se convierte en numérica aplicando un código numérico predeterminado (v.g., "motivo del examen": se enumeran ocho "motivos" y se anota en la casilla 46 el número correspondiente al motivo de que se trate);

- b) información (verbal o numérica) que no se va a tratar en ordenador; pero parte de esta información aparece también de manera codificada en la categoría precedente (v.g., el país donde probablemente se ha contraído la infección se da en palabras y en clave codificada); el resto consiste en información suplementaria que puede ser útil para el investigador, pero que no es necesaria para el tratamiento en ordenador (v.g., el nombre del paciente). Algunos investigadores pueden reunir y registrar otros tipos de información (véase la sección 1).

3. INSTRUCCIONES PARA RELLENAR EL FORMULARIO, SECCION POR SECCION

El formulario está dividido en secciones que se designan por una letra, desde la A a la I y de la K a la N; la sección J (macroprueba) se ha suprimido en este formulario. Cada espacio previsto para anotar datos, denominado casilla, lleva un número de identificación. Se lleva un registro de las personas seleccionadas mediante exámenes de detección, pero no se consignan en él los resultados de la detección.

- Las secciones A-H se rellenan en el momento de la extracción de sangre, es decir, la extracción de la sangre para el cultivo y el frotis previo al cultivo (que no se debe confundir con el frotis obtenido antes para la detección).
- La sección I se completa en el momento de examinar el frotis previo al cultivo.
- Las secciones K y L se rellenan en el momento de examinar el frotis de las pruebas.
- La sección M se rellena en los casos en que las pruebas han revelado una resistencia.
- La sección N se rellena cuando el investigador interpreta los resultados de la prueba (esta interpretación puede requerir gráficas, que quedan en poder del investigador).

3.1 Sección A: PAIS Y LUGAR DE LA PRUEBA

Se indica dónde se ha efectuado la prueba y se identifican la institución y la persona (investigador) que la han realizado. Por supuesto, en algunos países pueden efectuarse las pruebas en más de una institución y por varios investigadores. Para facilitar la labor del investigador se reserva espacio para una GIFRA NO CODIFICADA.

En la parte codificada, las casillas 1-4 corresponden al número de serie de la prueba, que es único en el ámbito del país (excepto si se han practicado más de 9999 pruebas en un país, en cuyo caso la numeración vuelve a iniciarse por 0001, 0002, etc.). Las casillas 5-7 y 8-9 están destinadas, respectivamente, a las letras de código del país (cada país tiene un Código de Letras ISO normalizado: véase el anexo 1) y al número de la institución (se supone que cada país asignará números de código a sus instituciones participantes). Las letras del código adoptado por la ISO para los países pueden diferir de las del correspondiente código de la OMS que se utilizaba con anterioridad pero que ha sido sustituido ya por el código ISO.

Con el fin de que los números de serie de la prueba (casillas 1-4) sean únicos en el ámbito del país, deben asignarse diferentes series de números a las diferentes instituciones que practiquen la prueba en un mismo país. Esta asignación debe hacerse por mutuo acuerdo entre el funcionario gubernamental responsable y los investigadores (v.g., los números 1 a 500 a la institución 01, los números 501 a 1000 a la institución 02).

3.2 Sección B: PAIS Y LUGAR DONDE PROBABLEMENTE CONTRAJO LA INFECCION

En algunos lugares la persona examinada puede haber contraído la infección fuera del sitio donde se practica la prueba, e incluso puede haberla contraído en otro país. Es muy importante identificar el lugar de la infección, si ello es posible. Para poner a los analistas en condiciones de identificar la zona con cierta seguridad, hay que dar la ubicación geográfica (coordenadas) de la zona de infección probable (dato que puede obtenerse directamente en el mapa o buscando la localidad más próxima en el índice de nombres geográficos de un atlas, así como en gacetas oficiales o en textos de referencia de los servicios de correos).

Las casillas 10-12 están destinadas a las tres letras del código ISO para el país (véase el anexo 1) y las 13-14 a las de la provincia o estado (se supone que cada país asignará números de código a sus subdivisiones principales, tales como estados, provincias o territorios). A las presentes instrucciones se adjunta una lista de las abreviaturas del código adoptado por la ISO para los distintos países. Las letras pueden diferir de las utilizadas anteriormente en el correspondiente código de la OMS.

La ubicación geográfica se codifica del modo siguiente: las casillas 15 y 20 se utilizan para consignar los puntos cardinales (Norte o Sur para la latitud, Este u Oeste para la longitud) y las 16-19 y 21-25 para precisar las indicaciones del mapa en grados y minutos. Es importante advertir que en las casillas 15 y 20 se escriben números y no letras.

3.3 Sección C: TOMA DE SANGRE

Se dan los detalles sobre el momento en que se practicó la prueba. En las casillas 26-27, 28-29 y 30-31, respectivamente, se consignan el día, el mes y el año (este último con dos cifras). La hora, utilizando el ciclo horario de 24 horas, se indica en las casillas 32-35, por el siguiente procedimiento: v.g., 1 de mayo de 1987, siete y media de la tarde (19.30 horas, según el ciclo horario de 24):

10/1/ 10/5/ 18/7/ 11/9/ 13/0/

3.4 Sección D: INCUBACION

Se registra el tiempo de incubación en horas y minutos (ciclo horario de 24 horas), consignando el comienzo en las casillas 36-39 y el momento de la terminación en las 40-43. La duración del tiempo de incubación se indicará en el espacio previsto al efecto (solamente en horas) pero no se codifica este dato por no ser necesario para el ordenador. El tiempo máximo admisible para una microprueba basada en la maduración de esquizontes es de 30 horas (véase la Parte A de este documento para más detalles).

3.5 Sección E: PACIENTE

El nombre y el sexo del paciente no se codifican y se consignan en el espacio previsto al efecto; la edad, en años, se codifica en las casillas 44-45 (si el paciente tiene menos de un año se ponen dos ceros).

3.6 Sección F: MOTIVOS DEL EXAMEN

Conviene conocer el motivo por el que se ha elegido a un paciente determinado para la detección, y este motivo se indica seleccionando una de las explicaciones numeradas de 1 a 8 y anotándola en la casilla 46. El código 8 comprende todos los motivos no mencionados entre 1 y 7.

3.7 Sección G: MUESTRA

También es importante conocer la procedencia del paciente, la cual se indica seleccionando una de las entradas numeradas de 1 a 7 y anotándola en la casilla 47. El código 7 comprende todas las procedencias que no figuran entre 1 y 6.

3.8 Sección H: MEDICAMENTO ADMINISTRADO EN LAS DOS ULTIMAS SEMANAS

En general, la prueba debe practicarse sólo en personas que no hayan tomado medicamentos antipalúdicos en las últimas 2 semanas. A veces, sin embargo, no es posible seguir esta regla y de ahí que se haya incluido esta sección. La respuesta a la pregunta "¿Se le administró algún tratamiento antipalúdico en las últimas 2 semanas?" se anota en la casilla 48 mediante la clave codificada correspondiente (1 = sí; 2 = no; 3 = no sé). Si la respuesta es "sí", se anota el nombre del medicamento, tal como lo menciona el paciente, en el espacio previsto al efecto y se incluye un número de código en la casilla 49, con arreglo al siguiente sistema:

<u>1</u> 4-aminoquinoleínas	<u>6</u> pirimetamina/sulfona
<u>2</u> proguanil	<u>7</u> antibióticos
<u>3</u> pirimetamina	<u>8</u> otros
<u>4</u> quinina	<u>9</u> desconocido
<u>5</u> pirimetamina/sulfamida	

Si el paciente ha tomado más de un medicamento separado, anótese el más reciente.

En las casillas 50 a 53 se anotan las determinaciones urinarias de la cloroquina (o amodiaquina), mefloquina, quinina y sulfadoxina. Esas determinaciones se anotan en la casilla respectiva, v.g., la columna 50 para la cloroquina, poniendo 1 si el resultado es positivo y 2 si es negativo. Si es dudoso, se pone 3, y si no se ha hecho análisis, 4.

3.9 Sección I: EXAMEN ANTES DEL CULTIVO

El examen del frotis previo al cultivo comprenderá el recuento de formas asexuadas de P. falciparum y de leucocitos. La única información que se codifica para el tratamiento informático es el número total efectivo de formas asexuadas de P. falciparum contadas, que ha de anotarse en las casillas 54-58, y el número efectivo de leucocitos contados, que se anotará en las casillas 59-62. Además, se ha reservado espacio para otra información que pueda ser de importancia para el investigador, pero que no se tratará en ordenador: el desglose según el tamaño de los anillos de P. falciparum efectivamente contados (pequeños, medianos y grandes) y el número de P. falciparum asexuados por mm³ de sangre.

3.10 Sección J: RESULTADO DE LA MACROPRUEBA

Como esta prueba ha sido casi totalmente sustituida por la microprueba, no figura en el formulario revisado. Los resultados de la macroprueba pueden aún anotarse en el formulario original mientras queden ejemplares del mismo.

3.11 Sección K: RESULTADO DE LA MICROPRUEBA

Se anotan los resultados de los recuentos de esquizontes en el testigo y en siete pocillos de prueba. A cada resultado se le asignan tres casillas y se han establecido filas distintas de casillas para la cloroquina, la mefloquina, la quinina, la SDX/PIR y la amodiaquina (casillas 63-86, 90-113, 117-140, 144-167 y 171-194, respectivamente). Los números de lote de las placas de prueba se anotan en las casillas 87-89, 114-116, 141-143, 168-170 y 195-197, respectivamente. El número de lote correspondiente al medio RPMI 1640 LPLF se anota en las casillas 198-199.

Son necesarias tres clases de anotaciones:

- cifras indicativas del recuento efectivo de esquizontes cuando se produce crecimiento;
- ceros cuando se hacen recuentos y no se observa ningún crecimiento de esquizontes: se supone que el recuento es cero después de haberse anotado ya dos recuentos cero consecutivos;
- rayas si la lectura es imposible, v.g., si se pierde una preparación en gota gruesa posterior al cultivo o si está muy contaminada.

He aquí tres ejemplos de lo anterior en la casilla del formulario correspondiente al resultado de la microprueba:

Ejemplo 1

K RESULTADO DE LA MICROPRUEBA

CLOROQUINA pmol/pocillo
 ESQUIZONTES/200 parásitos

63	1	4	1	1	5	2	1	5	1	1	3	2	0	6	7	0	1	5	0	0	4	0	0	0
	108 %		107 %		94 %		48 %		11 %		3 %		0 %											

Placa de prueba
 lote N°

--	--	--

Se trata de una infección resistente en la que se registra un crecimiento de esquizontes en todas las concentraciones salvo a 64 pmol.

(Adviértase que un recuento en el testigo superior a 200 es imposible, ya que el testigo representa el número de esquizontes en un recuento total de parásitos asexuados - trofozoítos y esquizontes - de 200.)

Ejemplo 2

K RESULTADO DE LA MICROPRUEBA

CLOROQUINA pmol/pocillo
 ESQUIZONTES/200 parásitos

63	1	4	1	1	2	2	0	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	87 %		36 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %		0 %	

Placa de prueba
 lote N°

--	--	--

Se trata de una infección sensible con crecimiento hasta la concentración de 2 pmol inclusive. Luego la lectura para las concentraciones de 4 y 8 pmol dio resultado negativo. De acuerdo con la regla de los "dos ceros consecutivos" se detiene aquí el recuento, pero, como se probaron las tres concentraciones restantes (16, 32 y 64 pmol), se consignaron ceros por haberse extrapolado que serían cero si se leyera el resultado.

Ejemplo 3

K RESULTADO DE LA MICROPRUEBA

CLOROQUINA pmol/pocillo
 ESQUIZONTES/200 parásitos

63	0	9	8	1	0	5	0	9	6	-	-	-	0	9	0	-	-	-	0	4	3	0	1	6
	107 %		98 %		-		92 %		-		-		44 %		16 %									

Placa de prueba
 lote N°

--	--	--

Infección resistente con pérdida de dos preparaciones en gota gruesa durante el proceso de tinción: concentraciones 4 y 16 pmol.

3.12 Sección L: COMPROBACION DE LOS FROTIS

Se indica si se han enviado los frotis a un centro de referencia para su verificación, anotándose en la casilla 200 la respuesta apropiada (1 = sí; 2 = no).

3.13 Sección M: DESPLAZAMIENTOS DEL PACIENTE

Se hace un breve resumen de los viajes del paciente durante los 12 últimos meses. La codificación de este dato no la hace el investigador sino el servicio de tratamiento informático de la sede de la OMS, en Ginebra.

3.14 Sección N: CONCLUSIONES

El investigador consigna aquí sus propias conclusiones sobre el caso. Esta información no se codifica.

RESPUESTA DE P. FALCIPARUM A LA CLOROQUINA, LA MEFLOQUINA, LA QUININA,
LA SDX/PIR Y LA AMODIAQUINA (PRUEBA IN VITRO)

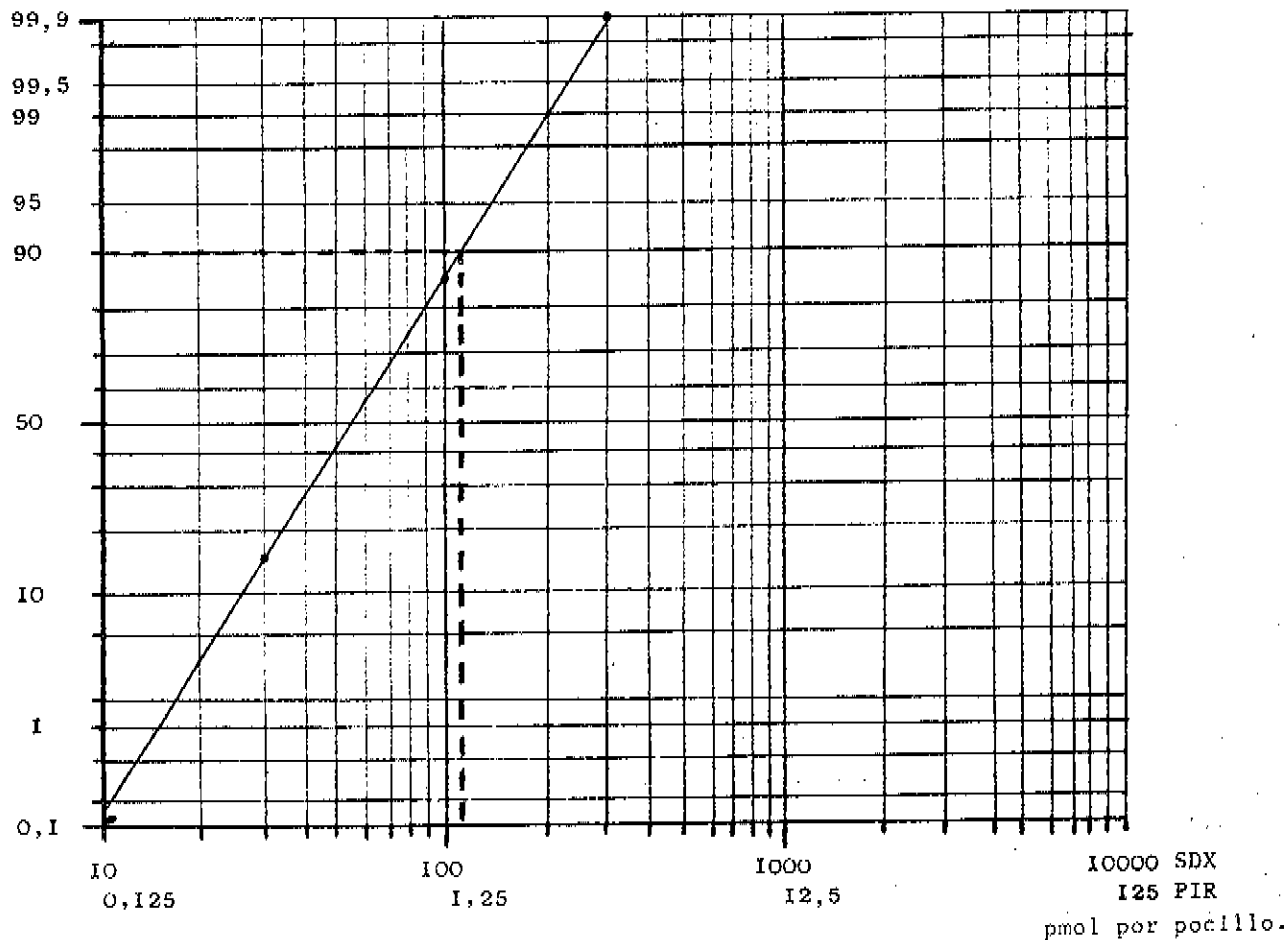
(Procérese que las concentraciones de fármaco en las placas de prueba coincidan con las indicadas en la sección K)

Revisión 1987

A PAIS Y LUGAR DE LA PRUEBA		No _____	No de Serie <input type="text"/>																																																																	
Institución _____	Ciudad/Pueblo _____		Código correspondiente al país: <input type="text"/>																																																																	
Investigador _____	País _____		Institución: <input type="text"/>																																																																	
Provincia/Estado _____	Distrito/Condado _____																																																																			
B PAIS Y LUGAR DONDE PROBABLEMENTE CONTRAJÓ LA INFECCION		Cód del país: <input type="text"/>	Cód de la prov: <input type="text"/>																																																																	
País _____		Lat en la casilla 15 <input type="text"/>	grados <input type="text"/>																																																																	
Provincia/Estado _____		1 = N 2 = S <input type="text"/>	min <input type="text"/>																																																																	
Distrito/Condado _____	Lugar _____	Log en la casilla 20 <input type="text"/>	grados <input type="text"/>																																																																	
		1 = E 2 = O <input type="text"/>	min <input type="text"/>																																																																	
C FECHA Y HORA EN QUE SE TOMÓ LA SANGRE		_____	_____																																																																	
		_____	_____																																																																	
D PERIODO DE INCUBACION		Se inició _____	Termino _____																																																																	
Fecha _____	Duración (horas) _____	_____	_____																																																																	
E PACIENTE			Edad <input type="text"/>																																																																	
	Sexo MF	Menos de un año: 00	años <input type="text"/>																																																																	
F MOTIVO DEL EXAMEN		<input type="checkbox"/> = Resistencia en la zona de origen <input type="checkbox"/> = Resistencia en la zona de origen (en otro país) <input type="checkbox"/> = Resistencia en zona vecina <input type="checkbox"/> = Resistencia en otra zona conexa	<input type="checkbox"/> = Vigilancia ordinaria <input type="checkbox"/> = Otro motivo _____																																																																	
<input type="checkbox"/> = Caso de resistencia o presunta resistencia <input type="checkbox"/> = Caso colateral de resistencia o presunta resistencia			<input type="text"/>																																																																	
G MUESTRA		<input type="checkbox"/> = Pobl en general <input type="checkbox"/> = Pobl escolar <input type="checkbox"/> = Trabajadores <input type="checkbox"/> = Paciente externo <input type="checkbox"/> = Paciente interno <input type="checkbox"/> = Trabajadores migrantes <input type="checkbox"/> = Otros	<input type="text"/>																																																																	
H MEDICAMENTO ADMINISTRADO EN LAS ULTIMAS 2 SEMANAS		¿ Se le administró algún medicamento antipalúdico? <input type="checkbox"/> = SI <input type="checkbox"/> = No <input type="checkbox"/> = ¿...? (casilla 48) HISTORIA CLINICA: En caso afirmativo especifique medicamento(s) _____ (casilla 49)	<input type="text"/>																																																																	
		ANALISIS DE ORINA: <input type="checkbox"/> = pos <input type="checkbox"/> = dudoso <input type="checkbox"/> = neg <input type="checkbox"/> = no se efectuó (casillas 50-53)	<input type="text"/>																																																																	
I EXAMEN DE LA MUESTRA ANTES DEL CULTIVO		FORMAS ASEJUADAS DE P. FALCIPARUM: pequeñas medianas grandes No de formas asexuadas por mm ³ de sangre _____ Recuento _____	total <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Recuento de leucocitos <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>																																																																	
K RESULTADO DE LA MICROPRUEBA			Placa de prueba lote N° <input type="text"/>																																																																	
CLOROQUINA pmol/pocillo →	ESQUIZONTES/200 parásitos →	<table border="1" style="width:100%; text-align: center;"> <tr> <th>Tratamiento</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> <th>13</th> <th>14</th> <th>15</th> <th>16</th> <th>17</th> <th>18</th> <th>19</th> <th>20</th> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td> </tr> </table>	Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	87 <input type="text"/>
Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20																																																
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>																																															
	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %																																															
MEFLOQUINA pmol/pocillo →	ESQUIZONTES/200 parásitos →	<table border="1" style="width:100%; text-align: center;"> <tr> <th>Tratamiento</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> <th>13</th> <th>14</th> <th>15</th> <th>16</th> <th>17</th> <th>18</th> <th>19</th> <th>20</th> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td> </tr> </table>	Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	114 <input type="text"/>
Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20																																																
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>																																															
	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %																																															
QUININA pmol/pocillo →	ESQUIZONTES/200 parásitos →	<table border="1" style="width:100%; text-align: center;"> <tr> <th>Tratamiento</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> <th>13</th> <th>14</th> <th>15</th> <th>16</th> <th>17</th> <th>18</th> <th>19</th> <th>20</th> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td> </tr> </table>	Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	141 <input type="text"/>
Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20																																																
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>																																															
	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %																																															
SDX/PIR pmol/pocillo →	ESQUIZONTES con 8 o más núcleos normales/200 parásitos →	<table border="1" style="width:100%; text-align: center;"> <tr> <th>Tratamiento</th> <th>10 (50%)</th> <th>50 (50%)</th> <th>100 (50%)</th> <th>300 (50%)</th> <th>1000 (50%)</th> <th>3000 (50%)</th> <th>10000 (50%)</th> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td> </tr> </table>	Tratamiento	10 (50%)	50 (50%)	100 (50%)	300 (50%)	1000 (50%)	3000 (50%)	10000 (50%)		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	160 <input type="text"/>																																									
Tratamiento	10 (50%)	50 (50%)	100 (50%)	300 (50%)	1000 (50%)	3000 (50%)	10000 (50%)																																																													
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>																																																													
	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %																																																													
AMODIAQUINA pmol/pocillo →	ESQUIZONTES/200 parásitos →	<table border="1" style="width:100%; text-align: center;"> <tr> <th>Tratamiento</th> <th>0-25</th> <th>0-50</th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>10</th> <th>15</th> </tr> <tr> <td></td> <td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td><td><input type="text"/></td> </tr> <tr> <td></td> <td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td><td>_____ %</td> </tr> </table>	Tratamiento	0-25	0-50	1	2	3	4	5	10	15		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>		_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	195 <input type="text"/>																																			
Tratamiento	0-25	0-50	1	2	3	4	5	10	15																																																											
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>																																																											
	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %	_____ %																																																											
		Medio RPMI 1640 LPLF LOTE N°	198 <input type="text"/>																																																																	
L ¿ Se enviaron las muestras a un laboratorio de referencia para verificar los resultados ?		<input type="checkbox"/> = si <input type="checkbox"/> = no	200 <input type="text"/>																																																																	
M ¿ Ha viajado el paciente durante los últimos 12 meses ? ¿ Adónde ?			201 <input type="text"/>																																																																	
N Conclusiones																																																																				

FIG. 1

Inhibición porcentual
del crecimiento



Interpretación

Para lograr una inhibición del crecimiento del 90%, en la escala vertical, la concentración medicamentosa eficaz es una combinación de SDX y PIR a razón de 110 pmol por pocillo de SDX y 1,4 pmol por pocillo de PIR.

LISTA DE PAISES O TERRITORIOS, POR REGIONES

Lista elaborada de acuerdo con el Código adoptado por la ISO* para representar los nombres de países, segunda edición, 1981-05-15.

<u>País o zona</u>	<u>Código</u>	<u>País o zona</u>	<u>Código</u>
AFRICA			
Angola	AGO	Malí	MLI
Argelia	DZA	Mauricio	MUS
Benin	BNE	Mauritania	MRT
Botswana	BWA	Mozambique	MOZ
Burkina Faso	HWO	Namibia	NAM
Burundi	BDI	Níger	NER
Cabo Verde	CPV	Nigeria	NGA
Camerún	CMR	República Centroafricana	CAF
Comoras	COM	República Unida de Tanzania	TZA
Congo	COG	Reunión	REU
Côte d'Ivoire	CIV	Rwanda	RWA
Chad	TCD	Santa Elena	SHN
Etiopía	ETH	Santo Tomé y Príncipe	STP
Gabón	GAB	Senegal	SEN
Gambia	GMB	Seychelles	SYC
Ghana	GHA	Sierra Leona	SLE
Guinea	GIN	Sudáfrica	ZAF
Guinea Bissau	GNB	Swazilandia	SWZ
Guinea Ecuatorial	GNQ	Togo	TGO
Kenya	KEN	Uganda	UGA
Lesotho	LSO	Zaire	ZAR
Liberia	LBR	Zambia	ZMB
Madagascar	MDG	Zimbabwe	ZWE
Malawi	MWI		
LAS AMERICAS			
Antigua y Barbuda	ATG	Haití	HTI
Antillas Neerlandesas	ANT	Honduras	HND
Argentina	ARG	Islas Caimán	CYM
Bahamas	BHS	Islas Turcos y Caicos	TCA
Barbados	BRB	Islas Virgenes Británicas	VGB
Belice	BLZ	Islas Vírgenes (Estados Unidos)	VIR
Bermuda	BMU	Jamaica	JAM
Bolivia	BOL	Martinica	MTQ
Brasil	BRA	México	MEX
Canadá	CAN	Montserrat	MSR
Colombia	COL	Nicaragua	NIC
Costa Rica	CRI	Panamá	PAN
Cuba	CUB	Paraguay	PRY
Chile	CHL	Perú	PER
Dominica	DMA	Puerto Rico	PIR
Ecuador	ECU	República Dominicana	DOM
El Salvador	SLV	San Cristobal y Nieves	KNA
Estados Unidos de América	USA	San Vicente	VCT
Granada	GRD	Santa Lucía	LCA
Guatemala	GTM	Suriname	SUR
Guadalupe	GLP	Trinidad y Tabago	TTO
Guayana Francesa	GUF	Uruguay	URY
Guyana	GUY	Venezuela	VEN

* Organización Internacional de Normalización.

<u>País o zona</u>	<u>Código</u>	<u>País o zona</u>	<u>Código</u>
ASIA SUDORIENTAL			
Bangladesh	BGD	Nepal	NPL
Buthan	BTN	República Popular Democrática de Corea	PRK
Birmania	BUR	Sri Lanka	LKA
India	IND	Tailandia	THA
Indoneisa	IDN		
Maldivas	MDV		
EUROPA			
Albania	ALB	Noruega	NOR
Alemania, República Federal de	DEU	Países Bajos	NLD
Austria	AUT	Polonia	POL
Bélgica	BEL	Portugal	PRT
Bulgaria	BGR	Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte	GBR
Checoslovaquia	CSK	República Democrática Alemana	DDR
Dinamarca	DKN	República Socialista Soviética de Ucrania	UKR
España	ESP	República Socialista Soviética de Bielorrusia	BYS
Finlandia	FIN	Rumania	ROM
Francia	FRA	San Marino	SMR
Grecia	GRE	Suecia	SWE
Hungría	HUN	Suiza	CHE
Irlanda	IRL	Turquía	TUR
Islandia	ISL	Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas	SUN
Israel	ISR	Yugoslavia	YUG
Italia	ITA		
Luxemburgo	LUX		
Malta	MLT		
Mónaco	MCO		
MEDITERRANEO ORIENTAL			
Afganistán	AFG	Líbano	LBN
Arabia Saudita	SAU	Marruecos	MAR
Bahrein	BHR	Omán	OMN
Chipre	CYP	Pakistán	PAK
Djibouti	DJI	Qatar	QAT
Egipto	EGY	República Arabe Siria	SYR
Emiratos Arabes Unidos	ARE	Somalia	SOM
Irán (República Islámica del)	IRN	Sudán	SDN
Iraq	IRQ	Túnez	TUN
Jamahiriya Arabe Libia	LBY	Yemen	YEM
Jordania	JOR	Yemen Democrático	YMD
Kuwait	KWT		

<u>País o zona</u>	<u>Código</u>	<u>País o zona</u>	<u>Código</u>
PACIFICO OCCIDENTAL			
Australia	AUS	Nueva Zelandia	NZL
Brunei Darussalam	BRM	Papua Nueva Guinea	PNG
China	CHN	Polinesia Francesa	PYF
Fiji	FJI	República de Corea	KOR
Filipinas	PHL	República Democrática Popular Lao	LAO
Guam	GUM	República Socialista de Viet Nam	VNN
Hong Kong	HKG	Samoa	WSN
Islas Cook	COK	Samoa Americana	AMS
Islas Salomón	SLB	Singapur	SGP
Japón	JPN	Territorio en Fideicomiso de las Islas del Pacífico	PCI
Kampuchea Democrática	KHM	Tokelau	TKL
Kiribati	KIR	Tonga	TON
Macao	MAC	Tuvalu	TUV
Malasia	MIS	Vanuatu	VUT
Niue	NIU	Wallis y Futuna	WLF
Nueva Caledonia	NCL		

= = =