



SALUD

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE PALUDISMO

**InDRE – RNLSP
2012**



SALUD

SECRETARIA DE SALUD

SALOMÓN CHERTORIVSKI WOLDENBERG

SECRETARIO DE SALUD

DR. PABLO KURI MORALES

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

DR. JESÚS FELIPE GONZÁLEZ ROLDÁN

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS

DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑONEZ

DIRECTOR GENERAL ADJUNTO

DRA. MA. DEL CARMEN GUZMÁN BRACHO

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

QFB. LUCÍA HERNÁNDEZ RIVAS

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

LIC. JESÚS OMAR CASTILLO HERNÁNDEZ

SUBDIRECTOR DE OPERACIÓN

QBP. IRMA HERNÁNDEZ MONROY

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

M EN C IRMA LÓPEZ MARTÍNEZ

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

QFB. ROBERTO VÁZQUEZ CAMPUZANO

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIA

QC. ISRAEL PARRA ORTEGA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

DRA. CLARA GORODEZKY LAUFERMAN

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

M EN C JUDITH ESTÉVEZ RAMÍREZ

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

DR. ERNESTO RAMÍREZ GONZÁLEZ

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y

VALIDACIÓN DE PRUEBAS

DRA. SONIA GALINDO VIRGEN

JEFA DEL LABORATORIO DE PALUDISMO



INDICE

ANTECEDENTES DE LA RNLSP PARA EL DIAGNÓSTICO PALUDISMO.....	4
MARCO LEGAL DE OPERACIÓN DEL LABORATORIO.....	5
ORGANIZACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE PALUDISMO.....	5
FUNCIONES DEL LABORATORIO CENTRAL DE REFERENCIA NACIONAL (INDRE).....	6
FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS ESTATALES.....	7
FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS A NIVEL LOCAL.....	8
ALGORITMOS DE DIAGNÓSTICO DE PALUDISMO.....	9
DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO.....	10
ESTÁNDARES DE CALIDAD.....	30
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO.....	30
TOMA Y MANEJO DE MUESTRAS CLINICAS.....	31
ENVIO Y RECEPCION DE MUESTRAS	32
PANELES DE EFICIENCIA PEEDMiVec.....	32
ENVÍO DE PANELES DE EFICIENCIA.....	33
ENVÍO DE RESULTADOS PEEDMiVec A INDRE.....	34
INFORME DE RESULTDOS PEEDMiVec A RNLSP.....	35
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	38
BIBLIOGRAFIA.....	39



ANTECEDENTES DE LA RNLSP DE MICROSCOPIASTAS DEL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES PARASITARIAS TRASMITIDAS POR VECTORES

Durante los años de 1920-1930, se enviaron profesores a instituciones del extranjero principalmente a Estados Unidos, para capacitación, en 1935 se considera la creación en México de un centro de investigación y docencia de las enfermedades de importancia en Salud Pública, inaugurado el 18 de Marzo de 1939 como el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET).

Dentro de las Prioridades se consideró el Paludismo que entonces ocupaba el segundo lugar como causa de mortalidad (130 X 100, 000 habitantes) y una morbilidad del 10% de la población general, asimismo la creación en el ISET del Laboratorio de Protozoología a cargo del Dr. Enrique Beltrán Castillo y dentro de sus funciones estaba la vigilancia de aves de mercado y pájaros silvestres y parasitados con *Plasmodium relictum* y el mantenimiento de las cepas de *P. gallinaceuauum* y *P. cathemerium*, donadas por Francia y Estados Unidos y dentro de las actividades del Laboratorio de Epidemiología y Estadística se estudió la distribución de la población de México, la epidemiología del paludismo y de la fiebre amarilla entre otros padecimientos. Entre 1981 y 1982, el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales acrecentó sus responsabilidades al asignársele el control de calidad de las ya existentes redes nacionales de diagnóstico de cáncer cérvicouterino, de tuberculosis, de paludismo, de lepra, del mal del pinto y dengue

Durante 1950 a 1954 el paludismo ocupó el tercer lugar como causa de defunción con un promedio de 25, 000 muertes anuales en una población de casi 16 millones de habitantes en el área palúdica. En 1955 se crea la Comisión Nacional para la Erradicación del Paludismo, en la fase preparatoria en 1956 se precisaron los límites del área palúdica 1, 150 000 Km², el 58% del Territorio Nacional, se realizó censo, la cartografía, reclutamiento y adiestramiento del personal, en cuya estructura el LABORATORIO CENTRAL DE PALUDISMO constituyó una pieza fundamental. Durante la creación de la Comisión Nacional de Erradicación del Paludismo en cuya estructura el Laboratorio Central de Paludismo, el modelo se reprodujo en todo el país dando lugar a la Red nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Paludismo



Posteriormente en la fase de ataque (1957-1961) en las localidades donde se logró interrumpir la transmisión (75 % del área palúdica inicial) se inició la fase de consolidación, continuando la de ataque en las áreas con persistencia.

En los años 1965-1970 una deficiente vigilancia epidemiológica ocasionó que, el área de consolidación se redujera hasta el 50% y 37% respectivamente. Posterior a este evento entre las acciones de mejora se planteó la OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA OPORTUNA DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

Entre 1981 y 1982, al ISET se le asigna el control de calidad de las ya existentes redes nacionales de diagnóstico de cáncer cérvicouterino, de tuberculosis, de paludismo, de lepra, del mal del pinto y dengue

El laboratorio central de esta red es reubicado en las instalaciones del ISET ahora Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE, 1985) formando parte de la RNLESP

En 1997 se inicia la Evaluación directa de los laboratorios del país aplicándose paneles de evaluación conformados en el Laboratorio del InDRE cuyos resultados generan la necesidad de una evaluación de la red de laboratorios mediante paneles que se conforman siguiendo procedimientos estandarizados, iniciando en 2005 el programa de evaluación externa del desempeño para los microscopistas de la Red de Parasitosis Transmitidas por Vector (PEEDMiVec) conjuntando los laboratorios de Paludismo, Enfermedad de Chagas y Leishmania con una periodicidad anual, participando en el Boletín Caminando a la Excelencia, que permite identificar áreas de oportunidad en el desempeño de las Redes nacionales.

Los presentes lineamientos de organización de la red de laboratorio de Paludismo referidos por el laboratorio de paludismo del departamento de parasitología del InDRE relatan los antecedentes y las funciones encomendadas a la Red Nacional de Laboratorios para el Diagnóstico de Paludismo

Asimismo sirve como base para orientar al personal en el desempeño ordenado de sus actividades y como elemento de consulta permanente.

Se actualizará cuando existan cambios de organización o funciones, notificándose oportunamente a las autoridades correspondientes.



MARCO LEGAL DEL LABORATORIO

Ley General de Salud.

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994 para la vigilancia epidemiológica.

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010 para la Vigilancia Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vector.

ORGANIZACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE PALUDISMO

La red nacional de laboratorios de diagnóstico de paludismo (RNLSP-Palu) la encabeza el laboratorio de paludismo, adscrito al departamento de Parasitología del InDRE, integrada por los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) a través del componente paludismo y los laboratorios de diagnóstico locales, aunado a todos los laboratorios públicos y privados que realicen el diagnóstico microscópico del padecimiento considerados como red de apoyo estatal. (todos los diagnósticos de paludismo emitidos por el sector salud deben ser ingresados por los integrantes de la red)

FLUJO DE TRABAJO DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES PARASITARIAS TRANSMITIDAS POR VECTOR

LABORATORIO DE PALUDISMO InDRE
(Laboratorio Nacional de Referencia, LNR)

muestras ↓ ↑ resultados

Laboratorios de Diagnóstico de Paludismo (LESP)
(Redes Estatales de Diagnóstico)



Laboratorios Locales de Diagnóstico de Paludismo
(Redes locales de Diagnóstico)



Redes de Apoyo Jurisdiccionales



Laboratorios Locales de Diagnóstico públicos y privados que realicen el diagnóstico de Paludismo



FUNCIONES DEL LABORATORIO DE NIVEL CENTRAL.

El laboratorio de Paludismo del Indre, es el Laboratorio Nacional de Referencia y es la pieza normativa para el diagnóstico, dentro de las funciones que competen al área de microscopía de la Red de Laboratorios se considera:

- Realizar el diagnóstico de paludismo que considerado de urgencia el servicio de diagnóstico es inmediato.
- Mantener algoritmos de referencia y criterios de interpretación de resultados pre-establecidos
- Realizar el control de calidad mediante el programa de evaluación del desempeño a los LESP y con el apoyo intermedio a los laboratorios de la red a través de:
 - Control de calidad interno
 - Monitoreo del desempeño de la Red de Laboratorios de Diagnóstico de Paludismo
 - Aplicación del programa de evaluación externa del desempeño (PEED)
- Capacitación en servicio para la formación de recursos humanos
- Capacitación anual del personal de la Red
- Supervisión directa a los laboratorios estatales
- Apoyo técnico a los laboratorios y microscopistas que lo requieran y soliciten
- Desarrollar investigación operativa en apoyo a la vigilancia epidemiológica
- Generar información de orden nacional en materia de diagnóstico, control de calidad, formación de recursos humanos e investigación operativa en la vigilancia epidemiológica que coadyuven para la toma de decisiones en el control y prevención de la enfermedad al programa nacional de salud.

FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS ESTATALES (LESP)

Para el Diagnóstico:

- Realizar los procesos analíticos para la investigación de la presencia o no de plasmodios en material biológico.



- Asegurar la calidad del diagnóstico en el laboratorio de paludismo
- Emitir en tiempo y forma los resultados de los exámenes de laboratorio, en caso de exceso de trabajo de acuerdo a la prioridad del diagnóstico.
- Referir muestras al InDRE para control de calidad y conformación del banco de láminas o en caso de duda diagnóstica
- Generar evidencia y notificar al órgano normativo estatal correspondiente los casos confirmados.
- Participar como mecanismo de apoyo técnico, proporcionando la información relacionada y requerida por el programa sustantivo del área de su competencia.

Para el Monitoreo del Desempeño:

- Evaluar que se lleven a cabo los procedimientos, métodos y técnicas estandarizadas.
- Seleccionar las muestras para control de calidad positiva y negativa del área de influencia del LESP
- Compilar las muestras de las Jurisdicciones y redes de apoyo
- Realizar el Monitoreo
- Reportar inmediatamente las incongruencias encontradas en la re-observación
- Análisis de la información generada
- Capacitar en el área de paludismo en apoyo a la vigilancia epidemiológica, al personal de los laboratorios locales del programa y demás instituciones del Sector Salud que lo requieran o se ha detectado a través del monitoreo del desempeño en el área de influencia
- Recabar, analizar y evaluar la información sobre la prestación de servicios de diagnóstico de paludismo de los laboratorios locales para el aseguramiento de la calidad de la red



- Alertar que no existan muestras de diagnóstico pendientes en los laboratorios, solo se aceptará disminución en el reporte diario de muestras observadas en el laboratorio si no existen muestras pendientes
- Supervisar el manejo del equipo asignado conforme a lo establecido en los documentos autorizados y manuales de operación correspondiente para el ASEC en la red estatal
- Proporcionar información de importancia detectada en el laboratorio mediante informes y, notas informativas, reportes de paludismo a la Dirección del LESP para que sea difundida a las instancias estatales correspondientes contribuyendo a la vigilancia epidemiológica estatal y nacional de manera veraz y oportuna

Para el PEEDMiVec

- Participar en la evaluación del desempeño del InDRE, a través de los programas oficiales correspondientes.
- Aplicar la evaluación del desempeño a los laboratorios locales de la red
- Generar la evidencia de la evaluación para la red, enviar copia de resultados al microscopista y al InDRE
- Organizar la información de estas actividades y proporcionarla cuando sea requerida por las instancias evaluadoras

Para capacitación

- Organizar el curso anual de capacitación estatal a los laboratorios locales de acuerdo a las necesidades detectadas a través del PEED o del monitoreo
- Mantener en niveles óptimos la capacidad diagnóstica de los integrantes de la red
- Capacitar a los microscopistas en el manejo del equipo nuevo
- Apoyo técnico a los elementos de la red que lo soliciten
- Proporcionar el curso de inducción al puesto del personal de nuevo ingreso y generar evidencia



Apoyo Técnico

- Participación en las urgencias epidemiológicas en el área de su competencia
- Colaborar y/o elaborar trabajos de investigación operativa que proporcione información prioritaria estatal, una vez que los protocolos sean aceptados por los comités de investigación.
- Apoyar con la preparación y/o evaluación de los reactivos que utilizan los integrantes de la red
- Apoyar en la selección para la adquisición y en el suministro de materiales y reactivos requeridos por los laboratorios de la red estatal de acuerdo a la evaluación proporcionada por el InDRE.
- Participar en la elaboración y actualización de los manuales técnicos referentes a diagnóstico y temas especializados (bioseguridad, manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos, etc.) para uso en el ámbito estatal y local.

FUNCIONES DE LOS LABORATORIOS A NIVEL LOCAL

- Recepción e identificación de las muestras recibidas
- Procesar las muestras de acuerdo a los procedimientos pre-establecidos
- Selección de las muestras que se van a observar de acuerdo a la prioridad del material biológico y número de muestras recibidas en caso de exceso de trabajo
- Observación microscópica de las muestras de acuerdo a los procedimientos Pre-establecidos
- Reportar los casos encontrados diario al jefe inmediato, en caso de *P. falciparum* inmediatamente, y llenar la tarjeta con los datos del paciente para el archivo y control de recaídas o reinfecciones llenando la C1 o equivalente para la investigación epidemiológica del caso
- Anotación de resultados en las formas B1; N1; N1C; Tabla de casos encontrados, etc.
- Llenado de las formas M1; M2 y M3 con los datos del anexo 6



ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO DE PALUDISMO

El diagnóstico etiológico de Paludismo se basa en la clínica, epidemiología y laboratorio mediante la presencia del parásito en sangre obtenida por digitopunción

Toma de la muestra

Es muy importante considerar tomar la muestra con la técnica apropiada para disminuir el riesgo de contaminación y no olvidar las medidas de bioseguridad, seleccionar el área palmar de la punta del dedo generalmente dedo medio o anular, si es necesario debe calentarse el área para aumentar la cantidad de sangre que fluye, limpiar el sitio de la punción, secar para que se forme la gota, evitar que haya restos de alcohol que fijarían los eritrocitos, tomar la gota gruesa y el extendido en un solo portaobjetos, secar a temperatura ambiente en posición horizontal protegerse del polvo y la contaminación, la gota gruesa tarda de 8 a 12 horas en secarse. En caso de urgencia puede secarse mediante un ventilador o estufa a 25°C, fija la muestra, pierde calidad pero disminuye el tiempo de emisión de resultados, si requiere diagnóstico urgente hacer la gota más delgada, dejar secar a temperatura de 25°C por 1 hora, teñir y observar la muestra.

Todos los laboratorios de paludismo deben tener la capacidad para diagnosticar las muestras de sangre. No deben rechazar muestras por no tener la calidad esperada, se requiere que el personal invierta más tiempo y realice un mayor esfuerzo y tener la experiencia para obtener el resultado correcto.

La calidad de las muestras tomadas en campo por notificantes voluntarios debe ser óptima, es necesario insistir permanentemente en que se debe lograr alta calidad en todas las muestras, a pesar de que debido a las condiciones en las que se toma no resulta sencillo obtener resultados satisfactorios. Se debe considerar que las muestras pueden tardar varios días procurar que sea menor de 5 días en llegar al laboratorio por la distancia entre las comunidades y el laboratorio, para que se conserve la muestra, es una de las razones por las cuales la calidad de la muestra hemática en la gota gruesa puede ser deficiente complicando el proceso y la lectura, aunque la toma de la muestra haya sido correcta

En este sentido, solo aquellos microscopistas con alta capacidad resolutoria para el diagnóstico de paludismo, serán capaces de evitar los errores de diagnóstico, por lo que



se requiere que el personal logre y mantenga una confiabilidad diagnóstica del 100% en base a las evaluaciones

Identificación de muestras

Las láminas se deben identificar con la clave correspondiente. La anotación se hace con lápiz sobre el extendido. La clave de identificación de cada muestra se construye en forma de una fracción con el número progresivo correspondiente a la muestra en el numerador y en el denominador se coloca en forma continua: la clave estatal-jurisdiccional que se construye con el número del estado correspondiente en la lista de las entidades federativas por orden alfabético, luego se anota el dígito correspondiente al número de jurisdicción sanitaria, posteriormente se coloca la letra m que indica microscopista y por último el número clave individual del microscopista en el estado. Esta identificación de cada lámina debe ser visible a simple vista. Se debe anotar la misma clave en la forma N1 correspondiente a la muestra. Las muestras tomadas por personal del Programa de Paludismo llevan la clave del trabajador que la tomó anotada en la misma área y en la B-1

Tinción de muestras para diagnóstico en el laboratorio

Las muestras hemáticas se deben procesar tan pronto lleguen al laboratorio, sin que esta acción implique riesgo alguno de perder la muestra. Cabe señalar que puede utilizar la técnica de tinción rápida si lo requiere y emitir los resultados de manera oportuna, no olvidar que por sí misma la muestra hemática y la tinción aún trabajadas bajo normas de calidad estrictas, con las mismas soluciones, reactivos y técnicos puede presentar variabilidad en el resultado obtenido.

Para las muestras de campo

- Todos los extendidos de las muestras que se reciben se deben fijar con alcohol metílico químicamente puro, evitando que el alcohol toque la gota gruesa, porque se fija y no puede ser deshemoglobinizada.
- Las muestras hemáticas con el frotis fijado y la gota gruesa se cubren con solución acuosa del colorante de Giemsa al 3% ó 5 %
- Se tiñen durante 30 a 45 minutos de acuerdo a la curva de tinción o la anotación



enviada en el frasco de colorante por el LESP, posteriormente se retira el colorante.

- Se lavan con la solución utilizada como diluyente
- Se dejan secar a temperatura ambiente colocadas en la gradilla.
- Cuando en el laboratorio hay 2 ó más microscopistas, la coloración la efectúa uno de ellos cada semana, turnándose en esta actividad

Observación de muestras

- Antes de iniciar la lectura de las muestras se revisa que el microscopio este limpio y en buenas condiciones generales.
- Se enciende la lámpara. Revisar la iluminación
- Se enfoca la muestra con el objetivo 10x y selecciona la mejor área en la gota gruesa.
- Sin desplazar la laminilla, se coloca una gota de aceite y se cambia al objetivo de inmersión. Se valora la calidad de la gota y de la tinción ya que estas características son fundamentales en el reconocimiento de los parásitos de acuerdo a la coloración que presentan.
- Se observan mínimo 100 campos microscópicos con el aumento total de 700x a 1000x del microscopio empezando del límite inferior izquierdo de la gota hacia arriba en forma vertical, al terminar esa línea avanzar hacia la derecha y hacia abajo y así sucesivamente, cuando la laminilla teñida es de buena calidad. Si la gota gruesa o la tinción son deficientes se aumenta el número de campos a observar de manera inversamente proporcional a la calidad de la gota
- Al terminar la observación, se regresa al objetivo 10x, la muestra se retira y elimina el exceso de aceite de inmersión con pañuelo facial
- La lámina se coloca en la caja seleccionadora de portaobjetos que consta de once casilleros. El primer casillero se destina para las láminas positivas, las negativas se colocan en los restantes casilleros de acuerdo al dígito final del registro nominal de la muestra

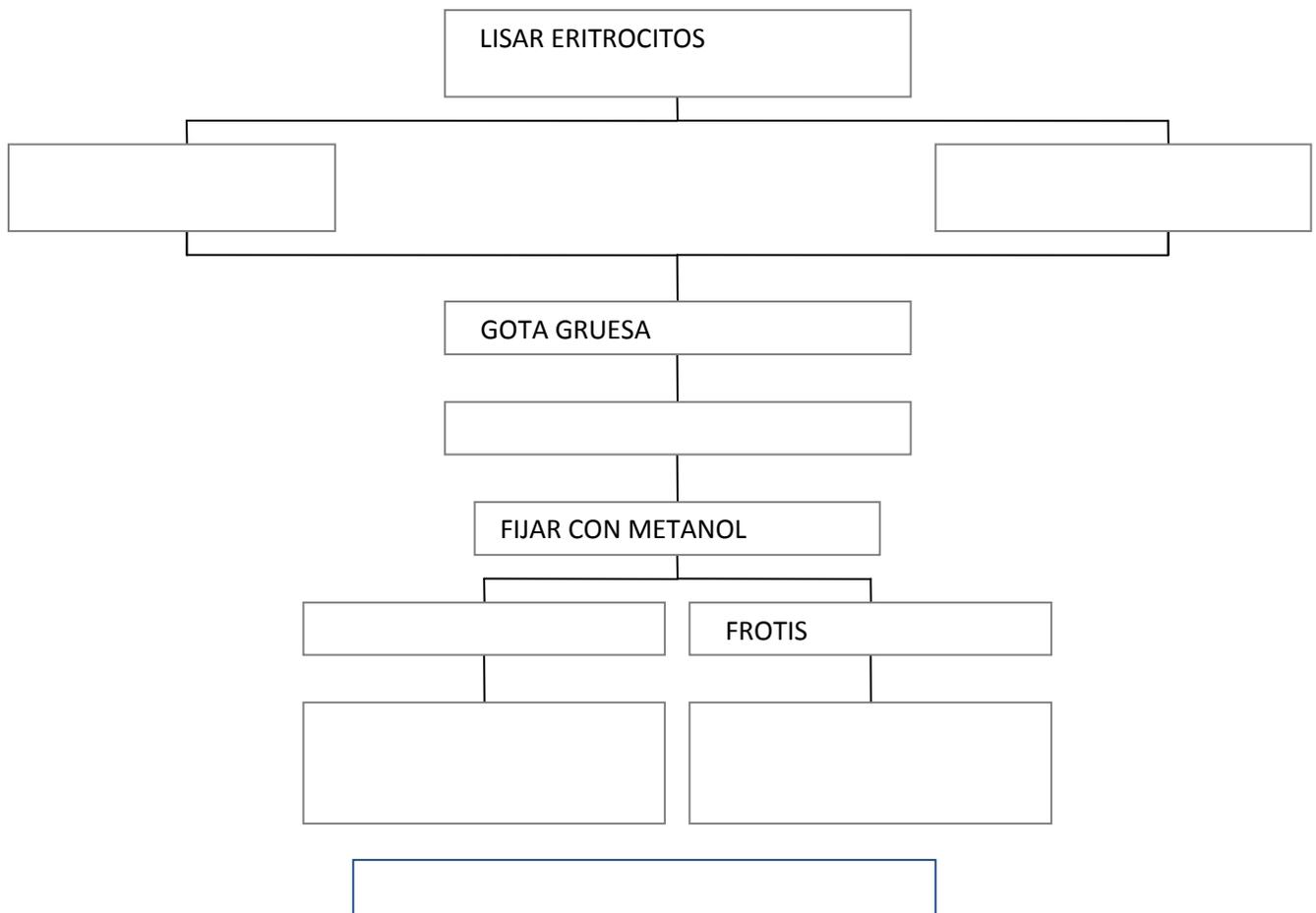


SALUD

ALGORITMO DIAGNÓSTICO

1.- ALGORITMO DEL DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DEL PALUDISMO. (CLAVE: 1D2614000:
Identificación morfológica del agente en muestras de sangre)

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, InDRE



POSITIVO

Infraestructura

- Al laboratorio de diagnóstico de paludismo se le debe asignar una área independiente siempre que sea posible. Por la naturaleza del trabajo, el personal requiere de un ambiente tranquilo, en habitación amplia, bien ventilada.



- En lugares calurosos y húmedos donde no tenga aire acondicionado, se sugiere el uso de ventilador eléctrico, de preferencia de techo, así como proteger las ventanas con tela metálica para evitar la entrada de insectos, los cuales además de que pueden contaminar el material biológico y los reactivos, son molestos para el personal.
- Requiere de tarja de tinción con agua corriente y drenaje

Material:

- Mesas de trabajo con altura de 75 a 85 cm y ancho mínimo de 80 cm, de preferencia de color negro opaco en la parte superior, con travesaños y espacio amplio para las rodillas
- Es indispensable proveer a cada microscopista de asientos que se adapten a su estatura con respaldo, de tal manera que la postura no cause fatiga innecesaria.
- Mesa de Trabajo, gabinete para guardar cristalería y papelería y, si requiere balanza se debe colocar sobre una mesa firme independiente.

EQUIPO

- Microscopio binocular con fuente de luz blanca azulada,
- Objetivos de 4x, 10x y 100x, o equivalentes (el objetivo marcador de campos microscópicos actualmente no se encuentran en el mercado) y
- Oculares 8x ó 10x.
- Filtro azul.

En climas cálidos en donde el laboratorio no tenga aire acondicionado el microscopio se debe guardar en un armario provisto de un dispositivo que permita mantener la temperatura interna por abajo de 35°C, sin humedad para evitar la formación de hongos sobre las lentes.

Material para toma de la muestra:

- Lancetas estériles
- Portaobjetos



- Algodón de fibra larga ó
- Gasa
- Alcohol etílico o merthiolate al 70%
- Formato N1 de notificación
- Lápiz de grafito
- Colorante Giemsa de buena calidad, glicerina y alcohol metílico ó
- Solución madre de Giemsa validada

Para la tinción:

- Solución madre giemsa
- Solución diluyente
- Alcohol metílico
- Cronómetro de 1 minuto a 2 horas
- Gradillas

Para lectura, almacén temporal y envío

- Aceite de inmersión tipo A o B según requiera
- Caja seleccionadora de muestras
- Caja seleccionadora de alto impacto para portaobjetos
- Cartón acanalado, cordel y papel de estraza para envolver
- Formatos de registro (M-1;M-2;etc.)
- Pañuelos faciales desechables
- Papel seda

Para la oportuna sustitución del equipo o partes dañadas el LESP debe tener en existencia:

- Objetivos de inmersión
- Oculares de 8x ó 10x
- Lámparas de halógeno de acuerdo a las especificaciones que tiene de los microscopios en uso en la red



- Focos
- Cristalería y
- Reactivos necesarios en su red estatal de laboratorios de paludismo, en la cantidad suficiente que evite la pérdida laboral de horas hombre por imprevistos.

Soluciones y reactivos

- Alcohol metílico
- Colorante de Giemsa
- Lancetas
- Microscopio
- Portaobjetos
- Solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2
- Torundas de algodón humedecidas en alcohol de 70%
- Torundas de algodón secas

Procedimiento

1. Realizar la punción digital,
2. Desechar la primera gota de sangre y limpiar con una torunda de algodón seca.
3. Obtener una segunda gota de sangre y colocarla sobre la mitad de una de las caras de un portaobjetos desengrasado.
4. Colocar frente a la gota un portaobjetos auxiliar en un ángulo de 45°, sujetarla por sus bordes mayores.
5. Proceder a extender la muestra con un movimiento uniforme hacia el extremo libre del portaobjeto, hasta terminar el extendido.
6. Dejar la preparación sobre una superficie horizontal hasta que se seque (protegerla de polvo, moscas y otros insectos).
7. Identificar sobre el extendido escribiendo con lápiz la clave de la muestra,



8. Para fijar el extendido, introducir la parte correspondiente al frote en un recipiente de boca ancha conteniendo alcohol metílico absoluto, escurrir el alcohol excedente, evitar que se moje la gota gruesa.
9. Colocar el portaobjeto sobre la gradilla, con la gota arriba y el extendido hacia abajo hasta que seque.
10. Teñir con Giemsa como se indica en el procedimiento de tinción de la gota gruesa.

Puntos críticos

Realizar el extendido de manera uniforme. Usar portaobjetos limpios y desengrasados. Evitar que se moje la gota gruesa con el alcohol metílico.

Gota gruesa

Es un método de concentración para buscar parásitos sanguíneos, tiene mayor sensibilidad que el examen directo y el frote. Es indispensable deshemoglobinizar la muestra sanguínea para que los eritrocitos acumulados no impidan la observación de los parásitos

Procedimiento

1. Obtener otra gota de sangre de la misma punción de donde se obtuvo para el frote sanguíneo.
2. Sobre la misma cara del portaobjetos donde se hizo el extendido, en la parte media del área libre, colocar otra gota de sangre más grande que la anterior.
3. Con el ángulo de un portaobjeto auxiliar y con movimientos en Z extender la gota en un cuadro de más o menos 1.2 a 1.5 cm. por lado.
4. Dejar la preparación sobre una superficie horizontal hasta que se seque, abanicar para obtener un secado más rápido (protegerla del polvo, moscas y otros insectos).

Puntos críticos

Cantidad de sangre suficiente. Extender la muestra antes de que inicie la coagulación.

Deshemoglobinizar la gota



Tinción

1. Preparar la solución de trabajo del colorante Giemsa con solución amortiguadora de fosfatos realizando una dilución al 3 ó 5 % de la solución madre. De acuerdo a evaluación
2. Cubrir las láminas con la solución de trabajo y dejar teñir durante 30 a 45 minutos.
3. Pasado el tiempo de tinción lavar el frote con solución amortiguadora
4. secar.

Punto crítico

El tiempo de tinción y la concentración deben estandarizarse cada vez que se prepara colorante.

LECTURA

1. Enfocar utilizando el objetivo de x10.
2. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la muestra a observar
3. Buscar sistemáticamente la presencia del parásito
4. Se observan mínimo 100 campos microscópicos con el aumento total de 700x a 1000x del microscopio empezando del límite inferior izquierdo de la gota hacia arriba en forma vertical, al terminar esa línea avanzar hacia la derecha y hacia abajo y así sucesivamente, cuando la laminilla teñida es de buena calidad. Si la gota gruesa o la tinción son deficientes se aumenta el número de campos a observar de manera inversamente proporcional a la calidad de la gota antes de emitir un resultado negativo.

Punto crítico

Verificar la iluminación, experiencia del observador, calidad de la muestra.

Almacén Temporal

La lámina se coloca en la caja seleccionadora de portaobjetos que consta de once



casilleros.

El primer casillero se destina para las láminas positivas, las negativas se colocan en los restantes casilleros de acuerdo al dígito final del registro nominal de la muestra.

ESTÁNDARES DE CALIDAD

El tiempo máximo para el reporte de resultados hasta finalizar con el algoritmo depende del servicio solicitado.

Para diagnóstico parasitológico: Frotis y Gota gruesa de 3 a 24 horas hábiles.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

1. La muestra de sangre total en volumen apropiado, deberá acompañarse del formato F-REM-01, del resumen de historia clínica y/o de la solicitud del estudio. Para laminillas (Frotis o gota gruesa) el requisito es el mismo. En el caso de no cumplir con el requisito, la muestra será analizada y se solicitará antes de entregar el resultado cumplir con los requisitos.
2. La laminilla (frotis y gota gruesa) deberá venir rotulada y no deberá estar rota o cubierta la muestra fresca con cubreobjetos imposible de recuperar, se notificará al usuario o responsable del envío vía fax.
- 3.- Todas las muestras para diagnóstico de paludismo se consideran casos especiales de alto valor si la muestra no cumple con los criterios de calidad biológica, el usuario acepta que el resultado es generado de acuerdo a las condiciones en las que se recibe la muestra anotando en el resultado las condiciones de calidad, valorada e interpretada con la expertiz del personal técnico, quedando el laboratorio del InDRE libre de toda responsabilidad legal.



TOMA Y MANEJO DE MUESTRAS CLINICAS

Paludismo	
Tipo	Sangre con anticoagulante
Nº de muestras y cantidad	1 muestra de 3 mL. de sangre
Momento de recolección	Al momento de la sospecha
Contenedor	Tubo de plástico herméticamente cerrado y rotulado
Conservación	Temperatura ambiente y procesar antes de las 4 hrs de la extracción.
Transporte	Enviar a temperatura ambiente
Observación	Referir al Laboratorio

Paludismo	
Tipo	Sangre
Nº de muestras y cantidad	2 muestras combinadas de sangre, gota gruesa y extendido en un portaobjeto
Momento de recolección	Al momento de la sospecha
Contenedor	Gota gruesa y extendido sobre vidrios porta objetos coloreado o no con giemsa
Conservación	Temperatura ambiente y libre de polvo e insectos
Transporte	Enviar a temperatura ambiente, vidrios protegidos
Observación	Referir al Laboratorio

PARA SU CORRECTA IDENTIFICACIÓN ES IMPRESCINDIBLE QUE CADA MUESTRA ESTE ROTULADA EN FORMA PREESTABLECIDA, ACOMPAÑADA CON LA FORMA N1

ENVÍO Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS

Envío de muestras clínicas: el envío de láminas debe realizarse lo más pronto posible, no más de cinco días. El tubo con la muestra de suero se empaqueta bien en un recipiente con doble cubierta y hermético y se envía de inmediato; se debe proteger de la luz solar y del calor excesivo con un refrigerante (4-8 °C), que no debe de estar en contacto directo con la muestra.



En el caso de la Secretaría de Salud la muestra se envía al Laboratorio Estatal de Salud Pública correspondiente. Para otras instituciones el envío se realizará de acuerdo con los procedimientos que se determine en el nivel estatal o federal.

InDRE / Instructivo para la Toma y Envío de Muestras Biológicas para Diagnóstico y Control de Calidad:

- http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/interior/intd_manuales.html
- Toma y recepción de muestras InDRE
- <http://www.cenavece.salud.gob.mx/indre/interior/tomayrecepcion.html>

PANELES DE EFICIENCIA PEED MiVec

En 1985 al incorporarse el laboratorio central de paludismo (que dentro de sus actividades se encontraba la supervisión directa e indirecta de la red de laboratorios para el diagnóstico de paludismo) al InDRE formando parte de la RNLSP genera información de calidad coordina y es referencia de la red nacional de laboratorios de diagnóstico de paludismo, brinda un servicio confiable y oportuno, de diagnóstico, formación de recursos humanos, control de calidad de la red de paludismo, evaluación de la competencia técnica, para fortalecer la toma de decisiones y sustento de la inteligencia epidemiológica en apoyo al Programa Nacional de Prevención y Control del padecimiento, en apego a las normas NOM-017 y NOM -032-SSA, a la norma ISO9001: 2008 al código de ética y las buenas prácticas de laboratorio.

Con esta base, el laboratorio del InDRE continúa en etapa de transición hacia la independencia diagnóstica de los laboratorios estatales con el monitoreo y la supervisión directa en caso necesario y en 2005 se inicia el programa de evaluación externa del desempeño para los microscopistas en el diagnóstico de parasitosis transmitidas por vector (PEEDMiVec) conjuntando los laboratorios de Enfermedad de Chagas y Leishmania, sumándose así al esfuerzo institucional de evaluar el desempeño de los



laboratorios de la RNLSP y contribuir a mantener y mejorar el diagnóstico de estos padecimiento

ENVÍO DE PANELES DE EFICIENCIA

El laboratorio Paludismo del InDRE es el organizador de PEEDMiVec y se encarga de:

- Producir el panel de láminas con respaldo documentado de las características de cada muestra,
- Embalar el panel en condiciones óptimas para el envío a los laboratorios participantes (previo envío de guía prepagada de paquetería), incluyendo instrucciones detalladas para el manejo del panel
- Elaborar y distribuir los formatos de reporte de resultados a los LESP participantes
- Evaluar los resultados de los LESP participantes.

Se envía un panel de láminas seleccionadas por procedimientos estandarizados a partir muestras de pacientes analizadas por la red y elaboradas en los laboratorios correspondientes del InDRE. Contiene muestras positivas para plasmodios, enfermedad de Chagas y Leishmania y negativas

Panel de 12 ó 24 láminas, que se envía en 3 partes, en la 3^a. semana de los meses de enero a abril de cada año

ENVÍO DE RESULTADOS PEEDMiVec AL InDRE

Los resultados deberán ser registrados en los formatos PALU-F-17 y PALU-F-18, El formato impreso PALU-F-17 le permite la evaluación y evidencia de la red estatal y envía copia al InDRE y en el formato PALU-F-18 registra los resultados del LESP que se evalúan en el InDRE que deberá enviar acompañados de los paneles

INFORME DE RESULTADOS PEEDMiVec A LA RED ESTATAL DE LOS LABORATORIOS DE SALUD PUBLICA



El LESP realizará un informe preliminar con los resultados de concordancia por participante local, que será enviado a cada participante. El objetivo de este informe preliminar es recibir comentarios y aclaraciones por parte de los laboratorios participantes dando margen de tiempo para esta actividad. El LESP deberá notificar a cada participante la solución a sus comentarios. El InDRE recibe una copia de esta información la cual analiza y el resultado final de los LESP aparece en el Boletín Caminando a la Excelencia tercer trimestre.

Se genera el informe global que se entrega a la Dirección General Adjunta del InDRE.

Los resultados serán expresados en resultados concordantes con las cifras globales del LESP

Una de las acciones de mejora iniciada por los LESP es la aplicación de un segundo. Panel de evaluación generado por el estado

BIBLIOGRAFIA

NOM-032-SSA2-2010, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.

NOM-017-SSA2-1994 Norma Oficial Mexicana para la Vigilancia Epidemiológica

Rodríguez MH; "Paludismo". Quinta Unidad. Enfermedades Parasitarias. Enfermedades Tropicales en México. Capítulo 2: pp267-275

WHO. Basic malaria microscopy.2010. Part 1.Learner's Guide.

López AF. 1988 Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en sangre.Cap. 5: Diagnóstico de la malaria. Publicación científica No. 512. OPS. Pp 39-50

Brown HW, Neva FA. Parasitología clínica. 1985, 5ª. Ed. Interamericana.pp 84-105



SALUD

López AF; Schmunis GA. Plasmodia of humans. Chapter 4. Parasitic Protozoa. Academic Press 1993, Vol. 5

Programas de acción. Paludismo. 2008. CENA VECE. México.

WHO, Implementation of the Global Malaria Control Strategy Report of a WHO Study Group on the Implementation of the Global Plan of Action for Malaria Control, Geneva 1993.

WHO. 2004. Guidelines for implementation of a quality management system in microscopic diagnosis of malaria. Malaria Light microscopy creating a culture of quality, Venezuela

OMS/OPS. 1960. Manual para el diagnóstico microscópico de la malaria. 4ª. Ed. Publicación científica No. 46.

OMS/OPS. 1975. Manual para el diagnóstico microscópico de la malaria. 4ª. Ed. Publicación científica Nos. 276.

National committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Documento M 15-T. Slide preparation and staining of blood films for the Laboratory Diagnosis of Parasitic. Vol. 12 No. 15, August 1992.

WHO, Malaria Light microscopy creating a culture of quality. Kuala Lumpur- Malaysia 21 April 2005. Informal consultation on quality control of malaria microscopy Geneva 3 March 2006

OPS/OMS (1996) Situación de los Programas de Malaria en las Américas XLIV informe. Washington, D. C. CD39/INF/2(Esp)



Adak T., Sharma V.P. and Orlov V.S. 1998. Studies on the *Plasmodium vivax* relapse Pattern in Delhi, India. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59(1):175-179.

Bunnag, D., Karbwang, J., Thanavibul, A., Chittamas, S., Ratanapongse, Y. and Chalermrut K. et al. 1994. High dose of primaquine in primaquine resistant *vivax* malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88:218-219.

Gascon, J., Gomez-Arce, J.E., Menendez, C., Valls, M. E. and Corochan M. 1994. Poor reponse to primaquine in two cases of *Plasmodium vivax* malaria from Guatemala. Trop. Geogr. Med. 46:32-33.

Gogswell F.B. 1992. The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria. Clinical Microbiology Reviews, Jan. Vol.5 No. 1:26-35.

Muhlberger N., Jelinek T., Gascon J., Probst M. Zoller T. et al. 2004. Malaria Journal 3:1-71 <http://www.malariajournal.com/content/3/1/5>.

Pérez H.A. 2004. El Paludismo por *Plasmodium vivax* y los desafíos del tratamiento adecuado y oportuno. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Vol. 54, No. 1:1-8

Roll Back Malaria, WHO, UNICEF. World Malaria Report 2005. WHO/HTM/MAL/2005.1102. http://rbm.who.int/wmr2005/pdf/intro_section.pdf

OPS/OMS,USAID; Guía para la implementación de un sistema de gestión de calidad en el diagnóstico microscópico de malaria: Estandarización de procedimientos y herramientas sobre el control de calidad y la evaluación externa del desempeño en las redes de laboratorio (Reunión del Grupo Técnico Asesor, Caracas, Venezuela, julio 2004) <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/ravreda-gerencia-calidad.pdf>



SALUD

OMS, External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. PHL,CDC,KNCV, RIT.

http://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/External_Quality_Assessment_for_AFB_Smear_Microscopy.pdf