

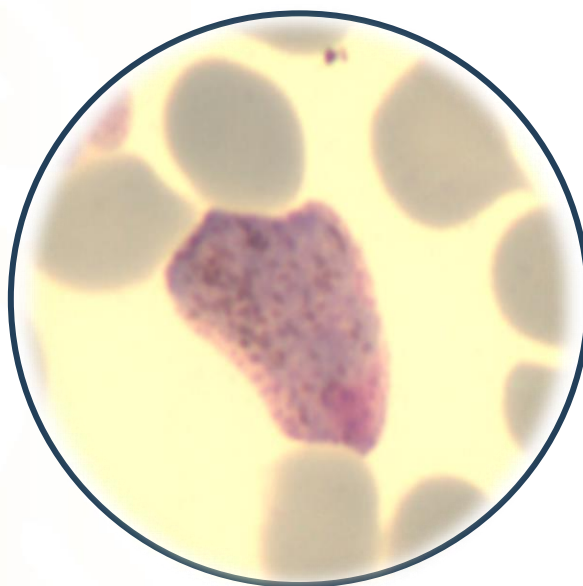
SALUD

SECRETARÍA DE SALUD

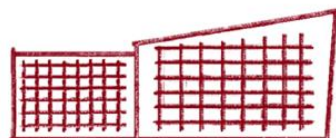


Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL PALUDISMO



InDRE



Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"

LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL PALUDISMO

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
“Dr. Manuel Martínez Báez”

2024

PRIMERA EDICIÓN. 2019

INDRE

ESTE DOCUMENTO FUE AVALADO POR LOS REPRESENTANTES DE LAS INSTITUCIONES QUE CONFORMAN EL GRUPO TÉCNICO INTERINSTITUCIONAL DEL COMITÉ NACIONAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA (CONAVE).

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: “INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”. LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DEL PALUDISMO, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2024”

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

ISBN: EN PROCESO

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”

FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, D.T. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480, CIUDAD DE MÉXICO, www.gob.mx/salud

TEL. (55)50-62-16-00

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: QFB ROBERTO VÁZQUEZ CAMPUZANO

EL DISEÑO Y LA REVISIÓN DEL CONTENIDO ESTUVO A CARGO DE: QFB ROBERTO VÁZQUEZ CAMPUZANO

IMPRESO EN MÉXICO. PRINTED IN MEXICO

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO CON roberto.vazquez@salud.gob.mx Y CON LA COORDINACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL PALUDISMO A TRAVÉS DEL CORREO: juan.serna@salud.gob.mx CON EL ASUNTO: CONTENIDO DE LINEAMIENTOS.

SECRETARÍA DE SALUD

Dr. Jorge Alcocer Varela

SECRETARIO DE SALUD

Dr. Ruy López Ridaura

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

Dr. Gabriel García Rodríguez

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS

“DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”

INDRE

Biól. Irma López Martínez

Directora de Diagnóstico. Y Referencia

M. en GS. Lucía Hernández Rivas

Directora de Servicios y Apoyo Técnico

C.P. Julie Jeannette Ramírez Hernández

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

Biól. Norma Angélica Montes Colima

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

M. en C. Judith Estévez Ramírez

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

MIBB. HIRAM OLIVERA DÍAZ

COORDINADOR DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

Dra. Herlinda García Lozano

ENCARGADA DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

Dra. Gabriela Meneses Ruiz

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

M. en. C. Imelda Eréndira Molina Gómez

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

GRUPO DE TRABAJO

DR. JUAN MANUEL SERNA VELÁZQUEZ

JEFE DEL LABORATORIO DE PALUDISMO

COORDINADOR DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA
VIGILANCIA DEL PALUDISMO

PERSONAL DEL LABORATORIO DE PALUDISMO:

MIC. MA. ISABEL LARA MAGADÁN

MIC. ANA MARÍA SEIDY ZAMORA CARRILLO

MIC. MA. MAURA LUNA ZARAZÚA

MIC. JORGE RODRÍGUEZ GUILLERMO

AUX. LAB. PATRICIA ELIZABETH GÓMORA ROSALES

LAB. RODOLFO NAVARRETE NOGUEZ

D. EN C. JUAN CARLOS CARPIO PEDROZA

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia del Paludismo	13
MARCO LEGAL	16
DEFINICIONES OPERACIONALES	19
OBJETIVOS	20
Objetivo General	20
Objetivos Específicos	21
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL PALUDISMO	21
FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL PALUDISMO	22
Funciones de los laboratorios a nivel municipal o jurisdiccional	22
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	25
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	29
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	31
Criterios de aceptación y rechazo de muestras	40
Muestras de alto valor	41
ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	42
CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO	45
PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO	47
CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DEL PALUDISMO	52
Los LESP perderán su liberación diagnóstica cuando ocurra cualquiera de los siguientes escenarios:	52
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	56
Anexo I: Bioseguridad en el Laboratorio	56

INTRODUCCIÓN

El paludismo, también conocido como malaria, es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Plasmodium* y transmitida al ser humano por la picadura de mosquitos hembra, del género *Anopheles*, infectados con el parásito. Existen alrededor de 150 especies diferentes de *Plasmodium*; sin embargo, solo 4 pueden infectar al ser humano: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*. En la actualidad existen reportes de casos aislados en Asia de paludismo ocasionado por *Plasmodium knowlesi* conocido por causar enfermedad en primates.

En general, cuando un *Anopheles* hembra ingiere sangre con el parásito en sus etapas sexuales (gametocitos), los gametos masculino y femenino se unen en el estómago del mosquito y forman el oocineto. A continuación, este atraviesa la pared gástrica y forma un quiste u oocito, en el que se desarrollan los esporozoítos durante un período de 8 a 10 días, dependiendo de la especie del parásito y de la temperatura. Los esporozoítos atraviesan la pared del quiste, llegan a las glándulas salivales y son inyectados a otra persona cuando el mosquito hembra se alimenta nuevamente.

En un hospedador susceptible, los esporozoítos infectan células del hígado y se transforman en esquizontes (exoeritrocíticos o hepáticos) los cuales al madurar liberan merozoítos al torrente sanguíneo donde infectan a los eritrocitos. En estas células sanguíneas los merozoítos se convierten en trofozoítos, los cuales crecen y se multiplican de forma cíclica. La mayor parte se convierte en formas asexuales, de trofozoítos a esquizontes sanguíneos maduros, que rompen el eritrocito entre 48 y 72 horas después de la infección y liberan de 8 a 30 merozoítos eritrocíticos (según la especie), que a su vez infectan a otros eritrocitos. Durante cada ciclo, la ruptura de eritrocitos va seguida por la liberación de un gran número de esquizontes eritrocíticos (liberando nuevos merozoítos y compuestos tóxicos propios del metabolismo del parásito), que ocasionan los síntomas clínicos. En el interior de los eritrocitos infectados, algunos merozoítos pueden transformarse en formas sexuales (gametocitos). Por lo general, los gametocitos aparecen en el torrente sanguíneo inmediatamente después de la parasitemia

manifiesta con *P. vivax* y *P. ovale*; y después de 7 a 15 días en *P. falciparum* (Figura 1).

En caso de *P. vivax* y *P. ovale*, al infectar a la célula hepática, algunos esporozoítos entran en estados de latencia y son conocidos como hipnozoítos, los cuales con el paso del tiempo (meses o años), tienen la capacidad de reactivarse produciendo “recaídas”. En la infección por *P. malariae* y *P. falciparum*, puede persistir un número escaso de parásitos en los eritrocitos que, al multiplicarse a un cierto nivel, ocasionan nuevamente los síntomas (recrudescencia).

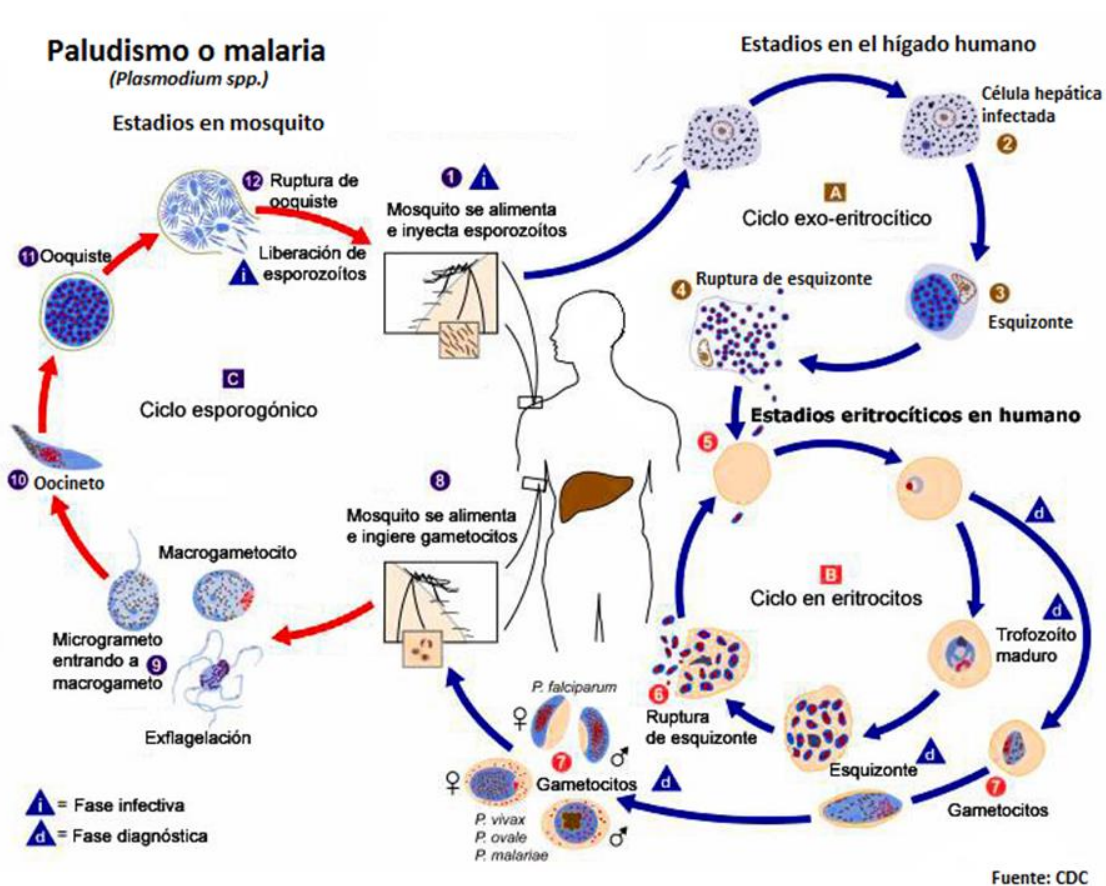


Figura 1. Ciclo de vida del *Plasmodium* spp. (Tomado y traducido de <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>).

De las especies de *Plasmodium* que causan el paludismo en los humanos, *P. falciparum* y *P. vivax* representan la mayor amenaza, esto es debido a que *P. falciparum* se asocia a la malaria complicada, con tasas

importantes de mortalidad y *P. vivax* es responsable de la mayor incidencia de la enfermedad a nivel global con excepción de África Subsahariana.

Las intervenciones de lucha contra el paludismo han llevado a disminuir de manera importante la morbilidad y mortalidad general; se calcula que, a nivel mundial, entre los años 2000 y 2015, la incidencia de paludismo disminuyó en un 37%, mientras que la mortalidad por esta enfermedad disminuyó 60%, con 6.2 millones de vidas salvadas. De acuerdo al Reporte mundial de malaria 2023, se estima que ocurrieron 249 millones de casos de paludismo en 2022 con 608,000 defunciones para 85 países endémicos, siendo la región de África la más afectada.

En la región de las Américas se registraron 550,000 casos representando el 0.2% de los casos en el mundo, de los cuales Brasil, Colombia y Venezuela declararon el 73% de todos los casos en la región. En México la disminución progresiva de casos en los últimos 20 años (más del 90%), registrando 45 casos confirmados por *Plasmodium vivax* en 2023, lo convierten en uno de los seis candidatos de América para eliminar la enfermedad en el corto plazo. Asimismo, de acuerdo al sistema de vigilancia epidemiológica de paludismo, los estados que presentaron casos autóctonos en 2023 fueron Campeche, Chiapas, Oaxaca y Tabasco.

En países como México que se encuentran en la etapa de eliminación, el enfoque de estratificación de riesgo, sub-estratificación en focos palúdicos y la operación a través de la estrategia DTIR (detección/diagnóstico-tratamiento-investigación y respuesta) es determinante para acortar la cadena de transmisión mediante la emisión de diagnósticos confiables y oportunos, así como el acceso a tratamientos de casos, tanto sintomáticos como asintomáticos que impidan generar casos secundarios.

El presente documento establece los lineamientos de operación para:

- La vigilancia epidemiológica de pPaludismo basada en el laboratorio con enfoque a eliminación.
- Estructura, organización y funcionamiento de la red nacional de laboratorios para el diagnóstico de paludismo.
- Procedimientos operativos estandarizados en el diagnóstico de paludismo (**anexo II**)

- La evaluación del desempeño de los laboratorios de la RNLSP.
- El sistema de aseguramiento de la calidad en el diagnóstico de Paludismo.

ANTECEDENTES

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

La Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) es el conjunto de laboratorios con objetivos específicos que permiten unificar métodos de diagnóstico, criterios de interpretación de resultados, transferencia tecnológica, generación de conocimiento y formación de recursos humanos que garanticen procedimientos técnico-administrativos que produzcan información de laboratorio útil para la vigilancia epidemiológica y la operación de los programas preventivos.

RNLSP es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica, genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas. Está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) como órgano rector de la misma, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal/institucional y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Su fundamento legal se encuentra en el reglamento Interior de la Secretaría de Salud y la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, componente vigilancia epidemiológica.

Como parte del marco analítico básico (MAB), en la RNLSP se cuenta con el diagnóstico y la vigilancia por laboratorio del paludismo.

Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia del paludismo

Durante el periodo 1920 a 1930, el personal encargado del diagnóstico de paludismo de la Secretaría de Salud recibió capacitación en el extranjero, principalmente en los Estados Unidos de América (EUA), sobre paludismo y otras enfermedades parasitarias de importancia en salud pública. En 1935 se consideró la creación de un centro de investigación y docencia en México, para las enfermedades de importancia en salud pública, con la participación del personal capacitado en la década anterior. Este proyecto se concretó en 1939 con la inauguración, el 19 de marzo, del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET).

Entre las enfermedades prioritarias para el ISET, el paludismo ocupó el segundo lugar por causa de mortalidad, con una tasa de 130 defunciones por cada 100,000 habitantes y una morbilidad del 10% en la población general. El Laboratorio de Protozoología del ISET, tenía dentro de sus funciones la vigilancia de aves de mercado y aves silvestres parasitadas con *Plasmodium relictum*, así como el mantenimiento de las cepas de *P. gallinaceum* y *P. cathemerium*, donadas por Francia y EUA. Otro laboratorio con funciones similares a las del ISET, fue el Laboratorio de Epidemiología y Estadística a cargo del estudio de la distribución de la población de México, la vigilancia epidemiológica del paludismo y la fiebre amarilla, entre otros padecimientos. De 1950 a 1954 el paludismo ocupó el tercer lugar en México 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 creó la Comisión nacional para la erradicación del paludismo que llevaba a cabo sus funciones con un programa de tres fases: preparatoria, ataque y consolidación. En 1956, durante la fase preparatoria se definió el límite del área palúdica: 150,000 Km² del territorio nacional; se realizó el censo y la cartografía, así como el reclutamiento y adiestramiento del personal participante en el programa, en cuya estructura se encontraba el Laboratorio Central de Paludismo, el cual constituyó una pieza fundamental. El modelo de este laboratorio se reprodujo en todo el país dando lugar a la Red Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Paludismo.

En la fase de ataque del programa (1957-1961) en las localidades donde se logró interrumpir la transmisión (75% del área palúdica inicial) se inició la última fase, denominada fase de consolidación, para continuar con la de ataque en las áreas con persistencia de la enfermedad.

Durante los años de 1965 a 1970 una vigilancia epidemiológica deficiente ocasionó que la fase de consolidación se redujera hasta el 50% y 37% respectivamente ocasionando un deterioro de las condiciones generales del programa. Posteriormente, entre las acciones de mejora, se estableció la observación microscópica oportuna de las muestras de sangre, como una medida específica de la vigilancia epidemiológica.

Entre 1981 y 1982, se le asignó al ISET el control de calidad de las redes nacionales de diagnóstico de cáncer cervicouterino, ya existentes, tuberculosis, paludismo, lepra, mal del pinto y dengue; y el laboratorio central de la red para el diagnóstico de paludismo se reubicó en las instalaciones del ISET, cuyo nombre había cambiado a Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (INDRE, 1985) formando parte de la Red Nacional de Laboratorios Estatales de Salud Pública (RNLSP).

En 1997 se inició la evaluación directa del desempeño para los laboratorios del país, a través de la aplicación de paneles de eficiencia generados en el Laboratorio de Paludismo del INDRE, cuyos resultados generaron la necesidad de una evaluación de la RNLSP, mediante paneles que se conformaron siguiendo procedimientos estandarizados. En 2005, se implementó el Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) para los microscopistas de la red de enfermedades parasitarias transmitidas por vector (PEEDMiVec) y que actualmente se denomina Ensayo de aptitud para microscopistas de enfermedades parasitarias transmitidas por vectores (EApMiVec), el cual conjunta muestras de los laboratorios de Paludismo, Enfermedad de Chagas y Leishmaniosis, e informa los resultados a los laboratorios, de acuerdo a lineamientos establecidos.

En enero de 2012 el laboratorio de paludismo del InDRE se certificó con base en los requerimientos de la Norma Internacional ISO 9001:2008. Sistemas de gestión de la calidad y en 2014 se acreditó con los

requerimientos de la Norma ISO 15189: 2012 para la acreditación de los laboratorios clínicos, con el objetivo de demostrar la competencia técnica en el proceso diagnóstico del paludismo.

En noviembre del 2012 el Laboratorio de Paludismo se incorporó al Programa de evaluación externa del desempeño del diagnóstico microscópico de paludismo para los países de Mesoamérica y el Caribe, establecido por el laboratorio de Referencia Supranacional (Laboratorio Nacional de Salud Pública) de la Secretaría de Salud de Honduras, a través de la Organización Panamericana de la Salud (OPS).

A partir de 2017, el Laboratorio de Paludismo del InDRE es designado como Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud y la OPS (OMS/OPS) para el entrenamiento en el diagnóstico del paludismo mediante microscopía (clave CC-Mex-29), a través del cual se han certificado microscopistas de laboratorios de referencia de países de la región, así como microscopistas de los laboratorios estatales, de acuerdo a criterios establecidos en el manual de aseguramiento de la calidad del diagnóstico microscópico de paludismo de la OMS, segunda edición.

Para 2019, se iniciaron las visitas de supervisión integral de eliminación del paludismo, con la participación del CENAPRECE-DGPS-DGE-InDRE y el acompañamiento de la OPS a los ocho estados que presentaron transmisión durante los últimos años (Campeche, Chiapas, Chihuahua, Nayarit, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora y Tabasco). En ese mismo año, se planteó la necesidad de utilizar pruebas rápidas, que permiten acortar los tiempos en el diagnóstico y tratamiento de casos en aquellas zonas que, por dificultad geográfica, política o social fuera imposible cortar la cadena de transmisión de la enfermedad. Con este motivo, se realizó un estudio piloto con la Prueba de diagnóstico rápido de paludismo (PDR), SD BIOLINE Malaria Ag P.f/P.v 05FK80 donada por la OPS, en los estados de Chiapas y Chihuahua en el periodo de octubre de 2019 a diciembre de 2020, con el objetivo de evaluar su operatividad en campo. Se capacitó al personal operativo del programa de prevención y control de paludismo, a personal del LESP, así como a colaboradores voluntarios de los estados de Chiapas y Chihuahua en el cuidado, uso y manejo de las PDR.

En el mismo periodo, se investigó la presencia de los antígenos HRP-II y pLDH del parásito, en 1062 personas sospechosas a paludismo por PDR, así como la búsqueda de parásitos en muestras de sangre por gota gruesa teñidas con Giemsa, mostrando una sensibilidad del 94.3% y especificidad del 100%, con valores predictivo positivo y negativo de 100% y 99.7% respectivamente, lo cual sugirió fuertemente, que la prueba rápida puede ser útil para el diagnóstico de paludismo en regiones en las que no se garantiza el diagnóstico, ni el inicio de tratamiento oportuno en nuestro país.

Finalmente, en 2023 se llevaron a cabo tres talleres regionales de capacitación de directrices para la eliminación y prevención del restablecimiento de la transmisión del paludismo con la participación de todos los componentes de salud (Epidemiología, LESP, Programa de vectores, Promoción de la salud; y Atención médica) de 29 entidades federativas, con el objetivo de armonizar los procesos enfocados a la eliminación y posteriormente evitar el restablecimiento de la transmisión del paludismo.

MARCO LEGAL

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo D.O.F. 06/06/2023.

Leyes

- Ley General de Salud, México. Última reforma publicada D.O.F. 29/05/2023.
- Ley Federal de Responsabilidades de los Servidores Públicos. D.O.F. 20/12/2023
- Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción 20/05/2021
- Ley General de Responsabilidades Administrativas 27/12/2022
- Ley Orgánica del Tribunal Federal de Justicia Administrativa. D.O.F. 26/01/2024.

- Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 26/01/2017.
- Ley de Infraestructura de la Calidad. D.O.F. 01/07/2020.

Reglamentos

- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud. México. DOF 07/02/2018.
- Reglamento Sanitario Internacional (2005) 2da edición. Ginebra Suiza 2008. Organización Mundial de la Salud.

Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, D.O.F. 19/02/2013.
- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014. Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. D.O.F. 16/04/2015.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 27/03/2012
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud. D.O.F. 07/01/2013.
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 22/10/1993; Modificación D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

- NMX-EC-15189-IMNC-2022 Laboratorios clínicos – Requisitos de calidad y competencia (ISO 15189:2012)
- NMX-CC-9001-IMNC-2015 Sistemas de gestión de la calidad – Requisitos (ISO 9001:2015)
- ISO 35001:2019 Gestión del riesgo biológico en el laboratorio.

Planes y programas

- Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024. D.O.F. 12/07/2019.
- Programa Sectorial de Salud 2019-2024 D.O.F. 17/08/2020.
- Programa de Acción Específico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, vigente.
- Programa de acción específico. Vigilancia en Salud Pública por laboratorio 2020-2024
- Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico: Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores 2020-2024.

Lineamientos y manuales

- Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector; Dirección General de Epidemiología. México: Secretaría de Salud; 2021.
- Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Lineamientos para la Gestión del Riesgo Biológico; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. México: Secretaría de Salud; 2019.
- Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”. México: Secretaría de Salud; 2019.
- Lineamientos para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico, Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. México: Secretaría de Salud; 2020.

DEFINICIONES OPERACIONALES

Las definiciones de caso se encuentran establecidas en el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector:

- **Caso probable:** toda persona que resida o provenga de área con antecedente de transmisión de paludismo (en los últimos tres años) y que en el último mes presente o haya presentado fiebre, más los siguientes signos y síntomas: cefalea, diaforesis y escalofríos.
- **Caso confirmado (fase eliminación):** toda persona en quien se compruebe, mediante métodos parasitológicos o moleculares reconocidos por el InDRE, la presencia de *Plasmodium* en sangre.
- **Caso descartado:** Todo caso probable en quien no se detecta la presencia del *Plasmodium* en sangre por las técnicas de laboratorio reconocidas por el InDRE.
- **Recaída:** es la reanudación de la manifestación de una infección por *P. vivax* o *P. ovale* surgida después de una latencia temporal de la activación de los hipnozoítos en un período de dos meses hasta 3 años. (Caso confirmado de paludismo debido a la activación de los hipnozoítos de *P. vivax* o *P. ovale* contraídos previamente).
- **Recrudescencia:** Reaparición de parasitemia de formas asexuadas después de un tratamiento antimalárico, debido a la eliminación incompleta de formas eritrocíticas asexuadas con el mismo o las mismas especies que causaron la enfermedad original.
- **Caso importado:** Caso confirmado en el cual se demuestra por evidencias epidemiológicas y parasitoscópicas que la infección se adquirió fuera del país.
- **Caso foráneo:** Todo caso confirmado detectado por una entidad federativa en la que no existe transmisión activa de paludismo y que mediante la investigación epidemiológica se demuestre que la infección se adquirió en otra entidad de la República Mexicana donde aún persisten focos de transmisión activos.

- **Caso Índice:** Caso cuyas características epidemiológicas desencadenan una detección activa de otros casos. El término “caso índice” también se utiliza para designar el caso que originó la infección de uno o varios casos introducidos.
- **Caso autóctono:** Todo caso confirmado contagiado localmente sin evidencia de importación y sin vínculo directo con la transmisión de un caso importado.
- **Caso inducido:** caso confirmado en el que el origen se atribuye a una transfusión de sangre u otra forma de inoculación parenteral del parásito, pero no a la transmisión por un mosquito.
- **Caso introducido:** Caso confirmado infectado localmente con evidencia epidemiológica que lo vincula directamente a un caso importado (transmisión local de primera generación).

Definición de microscopista: De acuerdo al Manual de aseguramiento de la calidad del diagnóstico microscópico del paludismo de la OMS (2a. edición) el término “microscopista” *se refiere a la persona que emplea un microscopio para examinar láminas de sangre con el fin de diagnosticar el paludismo e informar los resultados. Puede ser una de las tareas de un consultor principal de laboratorio, un investigador o técnico en un laboratorio de referencia o constituir la única actividad de un miembro del personal en un dispensario ambulatorio pequeño.*

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer y dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia del paludismo (RNLSPP-paludismo), las directrices encaminadas a garantizar resultados confiables y oportunos en el diagnóstico por laboratorio, a través de procedimientos estandarizados que conduzcan a acciones específicas que permitan tratar de manera correcta los casos, además de lograr la eliminación del padecimiento y la posterior prevención del restablecimiento de su transmisión, logrando un país libre de paludismo.

Objetivos específicos

- Garantizar la calidad del diagnóstico del paludismo.
- Ser el documento guía para el soporte técnico-científico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia del paludismo.
- Armonizar los procesos de diagnóstico del paludismo, mediante el cumplimiento de los lineamientos nacionales alineadas a recomendaciones de organismos internacionales.

Ámbito de aplicación

El presente documento aplica a todos los laboratorios que forman parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia del paludismo.

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL PALUDISMO

El Laboratorio de Paludismo del InDRE, como laboratorio rector en el LNR a nivel federal, es responsable de la coordinación de la RNLSP para diagnóstico, control de calidad, referencia, capacitación, actualización y evaluación de la competencia técnica y se encuentra adscrito al Departamento de Parasitología.

La RNLSP-paludismo está integrada por:

- Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP).
- Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica de la CDMX.
- Laboratorios locales que conforman la Red Estatal de Laboratorios de Salud Pública bajo las directrices del LESP (laboratorios municipales, jurisdiccionales, de centros de salud y de hospitales).

NOTA: Los laboratorios públicos y privados que no forman parte de la RNLSP pero que realizan el diagnóstico microscópico de paludismo, deberán notificar a la jurisdicción sanitaria correspondiente todo caso confirmado, con la finalidad de que la muestra sea leída por un laboratorio reconocido por el InDRE, o bien, se localice al paciente y se le tome una muestra adicional para confirmar o descartar el caso. Por otra parte, si laboratorios que no forman parte de la red reportan y notifican resultados positivos por metodologías diferentes a microscopía, se deberá confirmar o descartar el resultado a través de la RNLSP.

Organización de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la vigilancia del paludismo

De acuerdo con los datos del último consenso, la RNLSP-paludismo está conformada por 131 laboratorios locales, 1 LAVE (CDMX), 31 laboratorios estatales y el laboratorio nacional de referencia, en los cuales participan 193 microscopistas en nivel local, 77 en nivel estatal y 5 en nivel federal.

NOTA: Los laboratorios municipales y jurisdiccionales dependen operativamente del Programa de paludismo; sin embargo, en aspectos técnico-metodológicos dependen del InDRE, a través de los LESP.

FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DEL PALUDISMO

Funciones de los laboratorios locales

Para el diagnóstico

- Realizar el diagnóstico por microscopía del 100% de los casos detectados.
- Garantizar la lectura de muestras y la notificación de resultados en un plazo no mayor a 24 horas después de su recepción, incluyendo sábados, domingos y días festivos (ante la alta probabilidad de que el caso se confirme con base en la información clínica-epidemiológica).
Nota: En caso de periodos vacacionales y en aquellos en los que el microscopista no se encuentre en su localidad, se deberán remitir las laminillas a otro laboratorio, con la finalidad de asegurar la oportunidad en el diagnóstico.
- Realizar la toma de muestra de gota gruesa/extendido fino o PDR cuando sea requerido.
- Realizar el diagnóstico microscópico del paludismo conforme a lo establecido en los presentes lineamientos (anexo II)
- Colocar el resultado de la observación, la fecha de emisión más el nombre y clave del microscopista en el formato SIPE-N1 o en el

formato estudio epidemiológico de enfermedades transmitidas por vector ETV.

- Ante un resultado positivo, se deberá colocar la especie identificada, los estadios parasitarios y la densidad parasitaria.
- Notificar inmediatamente a los responsables de programa y epidemiología local, así como al laboratorio estatal, la confirmación de caso de acuerdo a su observación microscópica.
 - Proporcionar la información completa para la captura del resultado de caso confirmado en la plataforma de SINAVE-Vectores por el personal correspondiente (de acuerdo a lo establecido en el Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vector de la DGE).
- Regresar el formato N1 con la información del diagnóstico, a la sede de vectores para su captura en el Subsistema Integral de Monitoreo de Vectores (SIMV).
- Registrar la información generada en los formatos correspondientes: Bitácora de registro nominal de muestras leídas; formatos M1 (informe semanal y mensual) M2 (casos por localidades), M3 (envío semanal para control de calidad (anexo XII)
- Para los casos confirmados importados, solicitar que sea tomada una muestra de sangre capilar en papel filtro FTA™, Whatman idealmente grado 3 o sangre venosa en tubo con EDTA (tapón morado) antes de iniciar el esquema de tratamiento.
- Enviar al LESP la laminilla positiva relacionada al punto anterior, junto con el papel filtro FTA™, Whatman, o tubo con sangre y documentación completa (N1 o formato ETV e historia clínica en caso de tenerla) para su control de calidad.
- Gestionar la adquisición de papel filtro FTA™ o Whatman según necesidades.
- Realizar el diagnóstico microscópico en muestras de seguimiento de acuerdo a los tiempos establecidos y entregar los resultados de manera oportuna.
- Los microscopistas deben notificar a la autoridad correspondiente (jefe de programa, jefe jurisdiccional cualquier desabasto en insumos, o bien deterioro de equipo y mobiliario) con la finalidad de que pueda

ser subsanada y generar evidencia de la notificación. Asimismo, notificar al LESP para conocimiento y seguimiento.

- Realizar y enviar al LESP un informe trimestral de muestras leídas por microscopista de acuerdo a siguiente formato:

Relación trimestral de muestras leídas por la Red local de Laboratorios de Salud Pública de Paludismo					
Jurisdicción o Distrito/municipio	Clave de microscopista	Número de muestras leídas procedentes de personal de programa		Número de muestras leídas procedentes de notificantes (todas las categorías)	
		positivas	negativas	positivas	negativas

Para el control de calidad

- Enviar con periodicidad semanal el 10% de muestras negativas, el 100% de positivas y el 100% de seguimiento al LESP, para su control de calidad (indirecto). No obstante, si las características clínicas y epidemiológicas del paciente, sugieren una discrepancia con el resultado microscópico, realizar el envío de manera expedita (adjuntar formato N1 y M3). **NOTA:** Para conservar la integridad de las muestras, no tallar las laminillas, solamente quitar el excedente de aceite de inmersión por contacto con papel absorbente.
- Conservar las muestras negativas no enviadas al LESP envueltas en papel por semana epidemiológica durante seis meses e identificarlas con los siguientes datos: nombre del laboratorio municipal/jurisdiccional, número de la semana epidemiológica y clave del microscopista. Posterior a este tiempo, desecharlas en contenedores de Residuos Biológico Infecciosos para la categoría punzocortantes (contenedor rígido rojo) y llevar un registro.
- En caso de recibir la notificación de un resultado discordante por parte del LESP, el laboratorio deberá enviar el 90% restante de muestras negativas de la semana epidemiológica correspondiente para su control de calidad.
Participar en las evaluaciones del control de calidad directo (PEDMiVec) **NOTA:** Todos los microscopistas en función deben ser evaluados de manera anual, en caso de que esto no suceda, se deberá justificar vía oficio y reprogramar la evaluación.
- Recibir las supervisiones realizadas por el nivel estatal o federal y atender las observaciones encontradas.

Para la capacitación

- Capacitar en la correcta toma de muestra, su manejo y envío (gota gruesa y PDR) a personal de salud que realiza esta actividad o que capacita a notificantes voluntarios para realizarla (generar evidencia).
- Participar activamente en capacitaciones integrales programadas en el tema de toma de muestra y diagnóstico (generar evidencia).
- Comunicar al Laboratorio Estatal las necesidades de capacitación para personal de nuevo ingreso, así como la baja o modificación de actividades en el personal microscopista.
- Acudir a las convocatorias por parte del nivel estatal para la capacitación de nuevos microscopistas o capacitación de personal en función por el tiempo determinado.

Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública y LVE-CDMX

Los laboratorios de nivel estatal deben contar con un responsable de la red de microscopistas, que no necesariamente realice la actividad de analista, pero que tenga todo el conocimiento, seguimiento y supervisión de los laboratorios locales y que funja como enlace con las contrapartes del programa, epidemiología, atención médica y promoción de la salud estatal. Asimismo, se debe garantizar el contar con personal capacitado en el diagnóstico y suplencias.

En lo que refiere a la competencia del personal, cada LESP debe contar con al menos un microscopista certificado con nivel A o B, con base en los criterios de competencias escritos en el manual de aseguramiento de la calidad del diagnóstico microscópico de paludismo de la OMS, 2a edición.

Para el diagnóstico

- Realizar la toma de muestra de gota gruesa/extendido fino o PDR cuando sea requerido.
- Realizar el diagnóstico microscópico y notificar el resultado, de acuerdo a las directrices del presente documento, en un máximo de 24 horas, a partir de la recepción de la muestra (anexo II)

- Regresar el formato N1 con la información del diagnóstico, a la sede de vectores para su captura en el Subsistema Integral de Monitoreo de Vectores (SIMV).
- Capturar la información de laboratorio relacionada al caso confirmado en la plataforma SINAVE-Vectores, cuando la confirmación se haya realizado por el LESP.
- Revisar y capturar la información de laboratorio faltante en la plataforma del SINAVE-Vectores relacionada a los casos confirmados (incluye la modificación en caso de detectar errores).
- Tener la información y documentación completa de la totalidad de casos confirmados por los laboratorios locales (Número de caso en la plataforma de SINAVE-Vectores, formato N1, ETV y enviar al InDRE esta información, junto con el envío de laminillas para control de calidad y copia del formato N1 o estudio epidemiológico de enfermedades transmitidas por vector.
- Verificar que no exista rezago de muestras en los laboratorios locales, llevar un control documental y de seguimiento.
- Garantizar la lectura de muestras, considerando los periodos vacacionales de los microscopistas de la red de su estado, en caso de que los laboratorios locales no cuenten con el diagnóstico (por causas extraordinarias), el LESP asumirá el diagnóstico.
- Mantener actualizado el padrón de microscopistas y notificar al InDRE cualquier cambio en el mismo de manera oficial e inmediata.
- Verificar los procedimientos analíticos utilizados en el diagnóstico de paludismo.
- Participar en procesos de certificación/recertificación de personal (Evaluación nacional de competencias para microscopistas de malaria).
- Programar y realizar visitas de supervisión a los laboratorios locales una vez al año, además de supervisiones virtuales periódicas en las que se verifiquen las condiciones de infraestructura, equipo, mobiliario, procedimientos con base en los lineamientos, así como la información generada.
- Dar seguimiento de las necesidades en cuanto a infraestructura, material, equipo, insumos y personal en cada laboratorio municipal/jurisdiccional.

Para el control de calidad

- Realizar el control de calidad indirecto por microscopía a los laboratorios locales.
 - En caso de encontrar discordancias a los laboratorios locales, solicitar el 90% restante de muestras negativas de la semana epidemiológica en cuestión e implementar las medidas correctivas, de acuerdo a los resultados obtenidos (en caso de que se requiera).
- Retroalimentar a los laboratorios locales sobre el control de calidad realizado, a través de un informe de resultados con el análisis de concordancias, de acuerdo al estándar de servicio definido (**dar prioridad a casos confirmados y muestras que sugieran discrepancia en resultado**).
- Enviar el 10% de muestras negativas, el 100% de positivas, de seguimiento de caso, así como discordancias al InDRE para su control de calidad, indicando en el oficio la información detallada referente al envío (semana epidemiológica, número de muestras positivas, negativas, de seguimiento o discordancias enviadas, número de plataforma de SINAVE-vectores cuando aplique, si se utilizó PDR y su resultado, etc). NOTA: Para conservar la integridad de las muestras, no tallar las laminillas, solamente quitar el excedente de aceite de inmersión por contacto con papel absorbente.
- El envío de muestras para control de calidad al InDRE se debe realizar semanalmente; sin embargo, si por alguna cuestión no fuera posible el envío se dará un límite de tres semanas para su recepción (**muestras de alta importancia epidemiológica, realizar el envío lo antes posible**). Para los casos importados, enviar al InDRE junto con la laminilla positiva (remitida por el laboratorio jurisdiccional o por el LESP en caso de que sea quien realice el diagnóstico), una muestra de sangre en papel filtro FTA, tubo con sangre o papel Whatman para realizar técnica de PCR.
- Conservar las muestras negativas no enviadas al InDRE procedentes del nivel local envueltas en papel por semana epidemiológica de manera trimestral e identificarlas con los siguientes datos: nombre del laboratorio municipal/jurisdiccional de origen, número de la semana

epidemiológica y clave del microscopista. Posterior a este tiempo, desecharlas en contenedores de Residuos Biológico Infecciosos para la categoría punzocortantes (contenedor rígido rojo). Para las muestras de diagnóstico realizadas en el LESP, con resultado negativo y no enviadas al InDRE para control de calidad, estas deben ser resguardadas durante seis meses antes de ser desechadas.

- Realizar un cierre e informe trimestral de muestras procesadas de diagnóstico por cada laboratorio perteneciente a la red estatal (incluye muestras de diagnóstico leídas por el LESP), así como un informe de muestras recibidas y procesadas de control de calidad, este informe debe ser enviado vía correo electrónico durante la segunda quincena de abril, julio, octubre y enero del siguiente año siguiente con el siguiente formato:

Relación trimestral de muestras leídas por la Red Estatal de Laboratorios de Salud Pública de Paludismo						
Jurisdicción o Distrito/municipio	Clave de microscopista	Número de muestras leídas procedentes de personal de programa		Número de muestras leídas procedentes de notificantes (todas las categorías)		Número total de casos confirmados
		positivas	negativas	positivas	negativas	

Relación de muestras de control de calidad recibidas y procesadas por el LESP					
Trimestre	Número de muestras recibidas		Número de muestras confirmadas		No. de casos confirmados
	negativas	positivas	negativas	positivas	
Enero-Marzo					
Abril-Mayo					
Junio-Agosto					
Septiembre-Diciembre					

Para la capacitación

- Capacitar en la correcta toma de muestra, su manejo y envío (gota gruesa y PDR) a personal de salud del programa, epidemiología, atención médica y promoción de la salud estatal y generar evidencia.
- Participar activamente en capacitaciones integrales programadas en el tema de toma de muestra y diagnóstico (generar evidencia).
- Capacitar a personal de nuevo ingreso como microscopista con base en las necesidades de vigilancia, a solicitud y programación previa, con una duración de 2 semanas (80 horas), para personal con conocimientos en ciencias biológicas; y una duración mayor para personal que no cuenta con una formación en ciencias biológicas o

que después de las dos semanas no alcance un desempeño adecuado en la evaluación final (generar evidencia).

- Evaluar al personal capacitado con panel de muestras solicitado previamente al InDRE, con panel de muestras de referencia donado o con muestras caracterizadas por el LESP. En caso de que el resultado de la evaluación sea satisfactorio, el personal de nuevo ingreso puede realizar las actividades del diagnóstico con supervisión del 100% de sus muestras leídas por parte del nivel estatal (al menos 1 mes), para solicitar vía oficio su incorporación al padrón nacional de microscopistas (enviando las evidencias de todo el proceso vía electrónica).
- Realizar cursos de reforzamiento/actualización de las bases del diagnóstico, dirigidos a los microscopistas vía virtual o presencial de manera anual (generar evidencia).
Para los ensayos de aptitud de microscopistas de enfermedades parasitarias transmitidas por vectores (EApMiVec).
- Asegurar y coordinar, en conjunto con el programa estatal, la participación en el EApMiVec (control de calidad directo) del total de los microscopistas locales.
- Establecer acciones correctivas (re-capacitación) o de mejora (reforzamiento) a los microscopistas que obtengan resultados desfavorables en la evaluación anual del EApMiVec y enviar las evidencias de sus acciones al InDRE antes de la siguiente evaluación.

Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia

El Laboratorio de Paludismo del InDRE como LNR, es el órgano normativo para el diagnóstico del paludismo en México y tiene las siguientes funciones:

- Emitir las directrices, lineamientos y políticas a seguir en para el diagnóstico de paludismo.
- Mantener actualizados los algoritmos y criterios pre-establecidos de interpretación de resultados.
- Estandarizar, evaluar y verificar los procedimientos analíticos utilizados en el diagnóstico de paludismo.
- Desarrollar y conducir protocolos de investigación en apoyo a la vigilancia epidemiológica.

- Generar información confiable y oportuna de orden nacional, en materia de: diagnóstico, control de calidad, referencia, formación de recursos humanos e investigación operativa en la vigilancia epidemiológica por laboratorio, que coadyuve para la toma de decisiones en el control y prevención del paludismo, al programa nacional de salud.
- Coordinar actividades con el Grupo Técnico Nacional (Promoción de la Salud, Epidemiología Programa Nacional de Prevención y Control) encaminadas a la eliminación y posteriormente a evitar la reintroducción del paludismo.
- Coordinar las actividades de diagnóstico con la RNLSP-paludismo.
- Realizar el control de calidad indirecto (CCId) a los LESP y LVE-CDMX.
- Capacitar en la correcta toma de muestras y fundamentos del diagnóstico microscópico a personal de los laboratorios estatales.
- Realizar supervisión de la evaluación de la competencia técnica a los LESP.
- Certificar las competencias de los microscopistas a través de talleres de certificación/recertificación (Evaluación nacional de competencias para microscopistas de malaria por sus siglas en inglés NCAMM).
- Dar seguimiento a las actividades de supervisión, evaluación y capacitación directa de microscopistas de la red nacional a través de los LESP.
- Proporcionar apoyo técnico a los laboratorios estatales que lo requieran y soliciten.
- Asesorar y mantener el aseguramiento de la calidad en el proceso de diagnóstico a la RNLSP-paludismo considerando:
 - Infraestructura.
 - Reactivos y materiales.
 - Equipo.
 - Capacitación, actualización y reconocimiento de microscopistas.
 - Desarrollo y estandarización de procedimientos analíticos.
 - Identificación de necesidades para el fortalecimiento de las unidades de diagnóstico.
- Participar en el Programa de evaluación externa del desempeño coordinado por OPS (control de calidad externo).

- Realizar Talleres de certificación/recertificación internacional, a través de la evaluación externa de competencias para microscopistas, como parte de las actividades de Centro Colaborador OMS/OPS CC-Mex-29.

De acuerdo a su nivel, todos los laboratorios que conforman la red, deben asegurarse de contar con las condiciones óptimas de infraestructura, mobiliario, equipo e insumos para realizar los procedimientos operativos estandarizados del diagnóstico de paludismo.

TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

Para la vigilancia por laboratorio del paludismo, es necesario contar con muestras e información de calidad, respetar los días de tránsito y evolución que apliquen para cada técnica y cumplir las definiciones operacionales de caso vigentes. Para la vigilancia del paludismo, dentro del sistema especial de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por vector, las muestras deben cumplir las siguientes especificaciones:

Toma de gota gruesa y frotis

La obtención de muestras de gota gruesa y frotis representa una técnica básica que sigue siendo el procedimiento de referencia para el diagnóstico de paludismo, lo ideal es emplear sangre capilar obtenida por punción dactilar; sin embargo, se puede trabajar sangre venosa recién tomada y con EDTA (**Anexo II NOTA: se debe garantizar el envío y recepción del tubo al laboratorio el mismo día en que fue tomada, ya que el tiempo que pasa la sangre en el tubo, modifica la morfología de los parásitos, impidiendo la correcta identificación de la especie infectante**). Es fundamental obtener extensiones de sangre de buena calidad para lograr **diagnósticos correctos**. En lactantes, se puede obtener la muestra por punción del dedo gordo del pie. La muestra de sangre debe ser obtenida antes de que el paciente haya recibido tratamiento antimalárico.

Nota: Tener todos los materiales listos. Es importante que las láminas portaobjetos se encuentren limpias y desengrasadas; antes de realizar la técnica de toma de muestra, se deben llenar los formularios correspondientes (formato NI y/o estudio epidemiológico de las ETV, según sea el caso).

Clave de identificación de laminilla: En ocasiones, el personal que realiza la toma muestra, cuenta con una clave de tomador e identifica la muestra con su clave y número consecutivo. Sin embargo, cuando la muestra es recibida en el laboratorio para su diagnóstico, el microscopista debe identificar la muestra para asegurar su trazabilidad en formato de fracción, donde en el numerador debe ir el número consecutivo y en el denominador la clave del microscopista (representa una clave de observación, independientemente de quien tome la muestra). Ejemplo:

$$\frac{1}{21M1}$$

Donde:

Numerador: 1 equivale al número consecutivo

Denominador: 2 equivale al número de la entidad federativa, en este caso Baja California

1 equivale al número de distrito o jurisdicción dentro de la entidad federativa

M1 equivale al número de microscopista

Materiales:

- Portaobjetos de vidrio limpios y de buena calidad de 25x75mm, idealmente lisos y bordes pulidos **(en caso de contar con portaobjetos con un lado esmerilado, no colocar la muestra en este sitio).**
- Etanol al 70%
- Lancetas estériles
- Algodón absorbente (torundas)
- Guantes de látex o nitrilo
- Recipiente rígido para residuos infecciosos
- Lápiz de grafito o lápiz diamante

Medidas de bioseguridad:

Tomando en consideración que la toma de muestra se realiza tanto en unidades de atención médica o por el personal del programa de paludismo y notificantes voluntarios en campo, las condiciones para la toma de muestra pueden variar, es importante mencionar las precauciones de seguridad para disminuir riesgos biológicos por manipulación de sangre y objetos contaminados.

- Antes de tomar muestras de sangre, colocarse guantes de látex por seguridad y para no dejar residuos de grasa que puedan interferir en la preparación de la gota gruesa y frotis.
- Utilizar lanceta desechable y de un solo uso por paciente, no re-encapuchar lancetas y nunca reutilizarlas.

- Evitar contaminarse los dedos o las manos con sangre, en caso de suceder, limpiar inmediatamente con un algodón con alcohol y lavar la zona contaminada con agua y jabón lo antes posible.
- Colocar lancetas y vidrios rotos en recipiente para residuos punzocortantes.
- Obtener las muestras en un lugar bien iluminado.

Procedimiento para la toma de la muestra (figura 5):

1. Anotar los datos del paciente en el formato N1 o ETV.
2. Colocarse guantes protectores.
3. Elegir para la punción el dedo anular de la mano no dominante (en lactantes elija el dedo gordo del pie).
4. Tomar la mano del paciente y limpiar el dedo elegido con torunda humedecida con etanol al 70%, frotar con firmeza para eliminar la suciedad y grasa del dedo y estimular la circulación de la sangre. Asegurar que el dedo este caliente, si es necesario, aplicar un masaje suave. Esperar a que el alcohol del dedo se evapore.
5. Puncionar la yema del dedo con un movimiento rápido, usando una lanceta estéril nueva.
6. Presionar ligeramente el dedo para hacer brotar la primera gota de sangre.
7. Limpiar la primera gota de sangre con una torunda seca, cuidando de no dejar hebras de algodón en el dedo.
8. Se utilizan dos portaobjetos previamente lavados y desengrasados (en caso que sea imposible lavarlos, limpiarlos perfectamente con una torunda alcoholada y dejar que seque); en uno de ellos se depositan dos gotas de sangre, la primera gota (de 6 a 8 μL) colocada aproximadamente a un centímetro de distancia de la mitad del portaobjetos destinada para la gota gruesa y la segunda (de 3 a 4 μL) colocada en la mitad del portaobjetos utilizada para el extendido fino (se puede hacer uso de una plantilla). **NOTA: Sostener los portaobjetos solo por los bordes.**
9. Limpiar la sangre que quede en el dedo con una torunda limpia y seca.

10. No esperar entre la aplicación y extensión de las gotas de sangre, es deseable extender la sangre apoyándose sobre una superficie plana y firme.

a) Para preparar el frotis:

- a. Colocar el borde de un portaobjetos “extensor” limpio por delante de la gota de sangre colocada a la mitad del portaobjetos formando un ángulo de 45°.
- b. Desplazar lentamente el “extensor” hacia atrás hasta que entre en contacto con la gota de sangre y dejar que se extienda a lo largo del borde del “extensor”.
- c. Deslizar rápidamente el “extensor” hacia adelante (alejándose del centro) con un movimiento uniforme y continuo.

b) Para prepara la gota gruesa:

- a. Con la esquina del portaobjetos “extensor” distribuir con 3-6 movimientos rápidos y suaves la gota de sangre hasta formar un círculo de aproximadamente 1 cm de diámetro (también se pueden realizar los movimientos para formar un cuadro de 1 cm por lado).

11. Una vez elaborados, dejar secar al aire la gota gruesa y frotis, sobre una superficie horizontal.

12. Envolver la laminilla con el formato de Notificación N1 o con el estudio epidemiológico de enfermedades transmitidas por vector.

Notas:

- La gota gruesa debe secarse en horizontal y resguardada del polvo y las moscas.
- La gota gruesa podría autofijarse si queda expuesta al calor extremo, por lo que es preciso teñirla de inmediato.
- La gota gruesa se puede secar suavemente con un secador de pelo a temperatura templada o mediante algún otro método, pero se debe evitar que la muestra quede fijada por el calor, cosa que puede ocurrir con rapidez.
- No utilice un bolígrafo de tinta ordinaria ni de gel para rotular los portaobjetos, ya que la tinta se difundirá cuando se fije la extensión.
- Si la extensión se ha hecho correctamente, quedará poca sangre en el extensor, de modo que este podrá servir de portaobjetos de soporte para las extensiones fina y gruesa del paciente siguiente, en las que se utilizará como extensor un portaobjetos limpio sacado de la caja. No utilice más de una vez un mismo portaobjetos como extensor.

Manejo y envío de laminillas con gota gruesa/frotis

1. Las muestras, una vez secas y envueltas con los formatos mencionados, deben ser trasladadas al laboratorio más cercano con microscopista para su lectura, tomando en cuenta los tiempos que marca la estrategia DTI-R (Diagnóstico, Tratamiento, Investigación y Respuesta, esto es, todo caso probable debe ser confirmado o descartado por microscopía o prueba rápida en un plazo de 48 horas a partir del inicio de síntomas).
2. Las muestras envueltas pueden trasladarse dentro de una caja o un sobre (no es necesario triple embalaje) a temperatura ambiente.

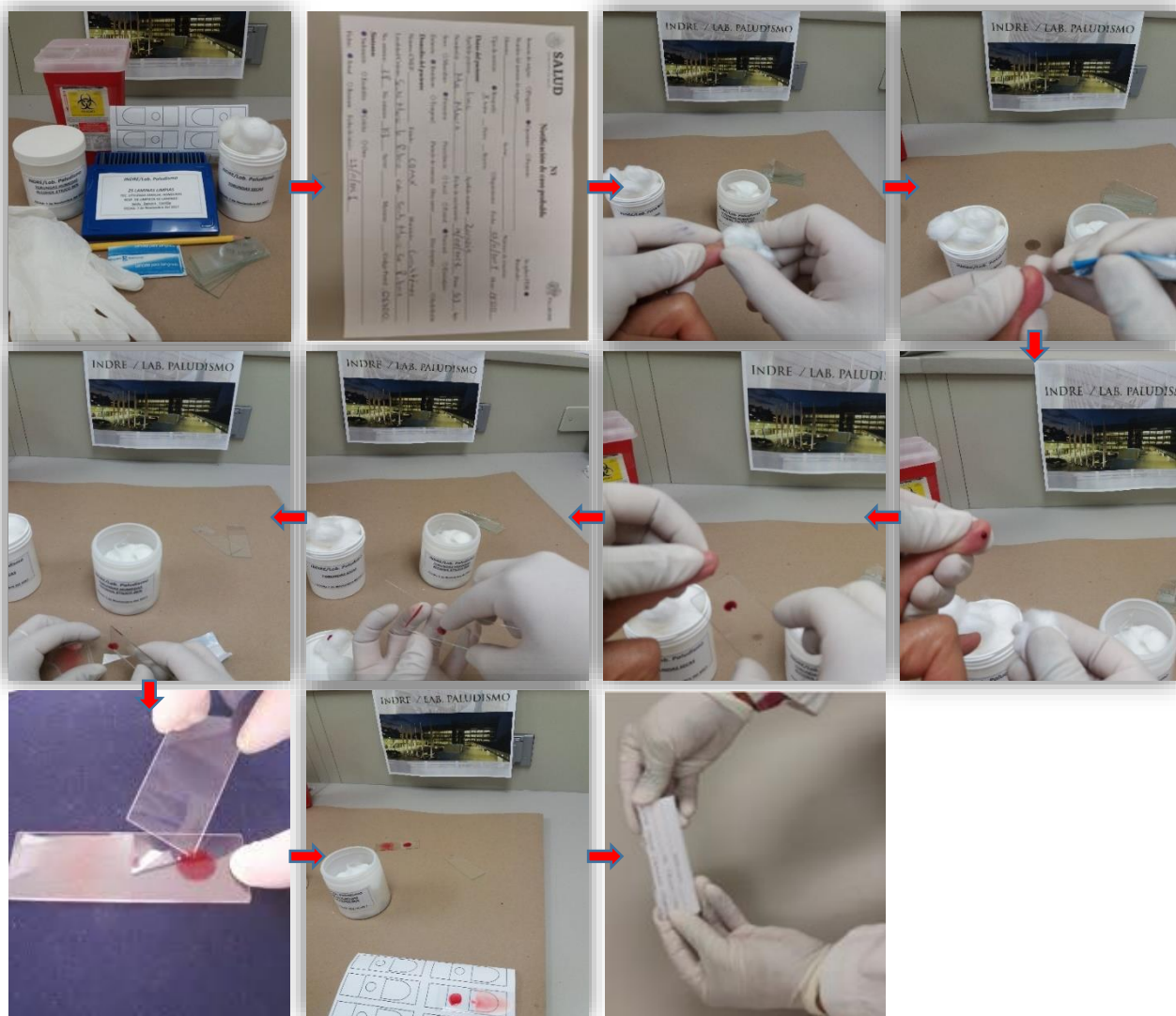


Figura 2. Técnica de toma de muestra de gota gruesa y frotis.

Toma de muestra de prueba rápida (PDR)

La prueba de diagnóstico rápido, es una prueba inmunocromatográfica, basada en la formación de complejos antígeno-anticuerpo. La detección de los complejos se realiza en la membrana de nitrocelulosa, en la que está anclado el conjugado (los anticuerpos específicos que reconocerán a los antígenos lactato deshidrogenasa, específicos para *P. vivax* y de la proteína 2 rica en histidina, específica para *P. falciparum*, presentes en la sangre de las personas infectadas y un reactivo de detección), los antígenos unidos al conjugado migrarán por la membrana hasta la zona

de captura, en la que se encuentra el anticuerpo de detección, que al formar el complejo antígeno-anticuerpo con el conjugado se quedan atrapados y forman una línea de color, en caso de ser positivas. La prueba cuenta con una zona de control, esta reconoce al reactivo de detección, de manera que cuando el resto de la muestra alcanza esta zona el anticuerpo se une al conjugado libre y esta unión da una línea de color. Esta línea de control es indispensable para validar la prueba.

El uso de prueba rápida no sustituye a la microscopía y debe ser utilizada en situaciones extraordinarias en las que no se garantice la oportunidad en el diagnóstico y su uso debe ser analizado y justificado por el equipo integral estatal.

Procedimiento (figura 3):

Cada caja de pruebas rápidas contiene un inserto con las instrucciones detalladas de operación, seguir las instrucciones del fabricante tomando en consideración los siguientes pasos generales.

1. Realizar pasos del 1 al 6 descritos en la toma de muestra de gota gruesa y frotis sanguíneo.
2. Extraer con una gota capilar (5µl de sangre capilar).
3. Depositar la gota de sangre en el pocillo para muestra.
4. Agregar 4 gotas de diluyente (por dispositivo) de manera vertical.
5. Esperar de 15 a 30 minutos para leer la prueba.
6. Interpretar los resultados de la PDR.
7. Colocar el resultado de la PDR en el formato N1.
 - Interpretación de la prueba: PDR positiva corresponde a caso confirmado, PDR negativa corresponde a caso descartado

NOTA: Toda prueba rápida debe estar pareada con gota gruesa y frotis para su aseguramiento de calidad mediante microscopía (la PDR no sustituye a la microscopía). El casete de la PDR y la laminilla con gota gruesa y frotis debidamente secos, deben ser envueltos en el formato N1.

Manejo y envío de PDR

1. Toda muestra de PDR tomada debe ser leída entre 15 y 30 minutos.
2. Toda PDR debe de estar acompañada de su gota gruesa y frotis.
3. Envolver la PDR junto con la laminilla seca en el formato N1 o ETV.

- 1**

Limpie el área a ser pinchada con alcohol



2

Pinche el dedo con la lanceta estéril y deseche de forma segura la lanceta



3

Con una pipeta capilar de 5µl extraiga la sangre hasta la línea negra



4

Deposite los 5 µl de sangre extraída al pocillo para muestras redondo



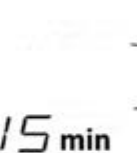
5

Agregue 4 gotas del diluyente para prueba. Verticalmente, en el pocillo para diluyente



6

Esperar como mínimo 15 minutos, máximo 30 minutos y lea el resultado



Prueba INVALIDADA



Resultado NEGATIVO



Resultado POSITIVO







InDRE
Mayo 2024

Toma de muestra sanguínea en papel filtro

La toma de muestra en papel filtro es solicitada una vez confirmado el caso, ya sea por PDR o microscopía, para los casos que se clasificarán como importados o en aquellos casos particulares que, debido a la importancia de vigilancia sean justificados.

Procedimiento:

1. Se realizan los pasos del 1 al 6 descritos en la toma de muestra de gota gruesa y frotis sanguíneo.
2. Colectar las gotas de sangre en el papel filtro, papel FTA™ o Whatman grado 3 (de 2 a 4 gotas de sangre formando un círculo de 2 cm de diámetro separadas aproximadamente con 1 cm de espacio), NO dejar caer la gota de sangre antes de que esté completamente formada, esto crea pequeñas manchas que deberían ser evitadas, NO dejar caer las gotas de sangre tan cerca que se superpongan, NO tocar con los dedos el papel filtro, en su lugar, dejar que la gota de sangre caiga o toque (no el dedo) la tarjeta de papel filtro.
3. En caso de que el paciente tenga manejo hospitalario y que se haya tomado sangre venosa en tubo con EDTA se pueden tomar y colocar 200 µL de sangre para formar los círculos sobre el papel filtro o, en su defecto, enviar oportunamente el tubo al laboratorio.
4. Dejar secar totalmente las gotas de sangre en el papel filtro.
5. Colocar el papel filtro en una bolsa tipo “Ziploc” sellada herméticamente y, de ser posible, con un paquetito de desecante.

Manejo y envío de muestras en papel filtro

1. Enviar al laboratorio oportunamente la muestra dentro de la bolsa “Ziploc” dentro de una caja o sobre, con la documentación correspondiente y los datos completos del paciente.
2. Las muestras se pueden enviar al laboratorio manteniéndolas a temperatura ambiente.

Manejo y envío de tubo de sangre en EDTA

1. Enviar al laboratorio de microscopía la muestra recién tomada.
2. El tubo debe estar debidamente rotulado con los datos del paciente y con fecha y hora de toma.
3. Enviar el tubo envuelto en gasa o material absorbente en un segundo contenedor rígido cerrado y puede ser trasladado a temperatura ambiente si y solo si, se garantiza su entrega en el laboratorio el mismo día en que fue tomada, en caso de que el envío no sea inmediato se debe realizar el traslado en red fría (entre 2 y 8 °C), es decir, en un tercer contenedor como una caja de unicel (aislante térmico) y geles refrigerantes.
4. Las muestras deben estar acompañadas de su documentación completa.

Criterios de aceptación y rechazo de muestras

Se dice que una muestra cumple con los estándares de calidad cuando:

- La gota gruesa y el frotis se encuentran correctamente ubicados y orientados.
- Tamaño adecuado (gota gruesa con 1 cm de diámetro, o bien, por lado si es cuadrada y frotis de 3 cm aproximadamente).

Aceptación:

- Cumple con la definición operacional de caso probable.
- Muestra de gota gruesa y frotis en una misma lámina portaobjetos.
- Muestra con formato N1 o ETV con datos correctos del paciente y cuando aplique oficio de solicitud.
- La gota gruesa y el frotis se encuentran correctamente ubicados y orientados.
- Tamaño adecuado (gota gruesa con 1 cm de diámetro, o bien, por lado si es cuadrada y frotis de 3 cm aproximadamente).
- En caso de recibir sangre venosa, esta debe estar contenida en un tubo con EDTA (tapón morado) y que no tenga más de un día de haber sido tomada.
- PDR pareada con laminilla de gota gruesa y frotis.

Rechazo:

- Muestras de gota gruesa y frotis en laminilla rota que impida su tinción y observación.
- Muestras de gota gruesa y frotis que no se permitió secar adecuadamente, envuelta en el formato que impida su tinción y observación.
- Muestras sin documentación (formato N1 o ETV).
- Muestras de sangre venosa en tubo sin anticoagulante (tapón rojo o amarillo).
- Cantidad insuficiente de sangre que impida leer al menos 200 campos microscópicos en gota gruesa (menos del 25% del área de gota gruesa/frotis correcto).

Muestras de alto valor

En la actualidad, México se encuentra en proceso de eliminación del paludismo, por lo que las muestras que no cumplan con alguno de los criterios de aceptación, pero representan muestras de alto valor epidemiológico, por ejemplo, muestras procedentes de personas en contexto de movilidad, muestras de casos probables de zonas alejadas, entre otras, deben ser analizadas como muestras concesionadas, por ejemplo:

- Muestras que no contengan gota gruesa (solo frotis).
- Muestras de gota gruesa desprendidas.
- Muestras de gota gruesa y frotis mal ubicados o de tamaño inadecuado.
- Muestras de gota gruesa fijadas por tiempo o temperatura.

Cuando el laboratorio opta o recibe la indicación para procesar la muestra concesionada se debe asegurar que en el informe de resultados el laboratorio que procesa la muestra indique la naturaleza del problema y se especifique que se requiere precaución cuando se interprete el resultado.

En algunas ocasiones, en las muestras concesionadas no es posible realizar la estimación de la parasitemia, por lo que en el informe de prueba se deberá colocar la leyenda *“No se realizó la densidad parasitaria debido a la mala calidad en que se recibió la muestra”*.

NOTA: En caso de que se reciba una muestra identificada y que no sea trazable con la identificación en el formato correspondiente, esta será procesada y se deberá notificar al solicitante la corrección de información para liberar el resultado.

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico por laboratorio inicia a partir de la detección de caso probable en unidades de notificación (vigilancia pasiva) o personal específico del programa de vectores (vigilancia activa), los cuales toman la muestra (idealmente gota gruesa y frotis, o PDR pareada con gota gruesa, o de manera excepcional, sangre venosa en EDTA) y la envían al laboratorio de microscopía más cercano, dentro de los tiempos de oportunidad que establece el DTI-R. Una vez recibida, se realiza el diagnóstico o verificación de la PDR mediante la técnica “Detección microscópica del *Plasmodium spp*, en la gota gruesa y extendido fino de sangre periférica teñida con Giemsa” que constituyen el estándar de oro, para el descarte o confirmación del caso y el inicio del esquema de tratamiento, según corresponda. Ante un caso confirmado y que sugiera o se confirme que corresponde a una clasificación de caso importado, se solicitará muestra sanguínea en papel filtro FTA™, Whatman idealmente grado 3, o tubo con sangre en EDTA para realizar estudios moleculares como la confirmación de casos por PCR.

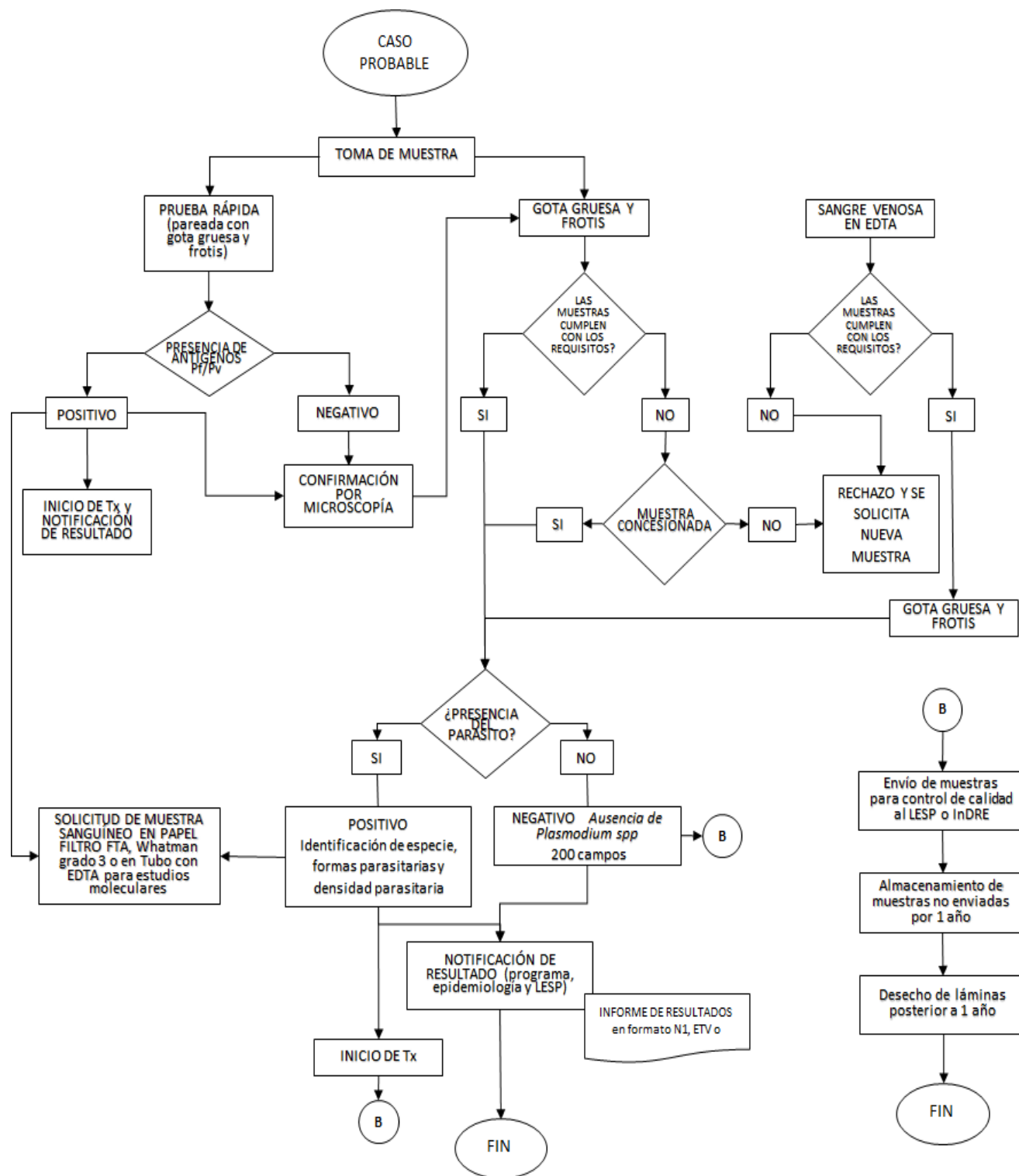


Figura 4. Algoritmo del diagnóstico parasitológico del paludismo. Clave de tabulador: ID2614.

VERIFICACIÓN DEL MÉTODO DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE PALUDISMO

Con la finalidad de demostrar la veracidad de los resultados se requiere determinar en cada laboratorio el desempeño del procedimiento de diagnóstico mediante una verificación, la cual va a depender de las condiciones y características de los parásitos que prevalecen en las distintas regiones; parasitemias bajas, la cual varía de acuerdo a la intensidad de la transmisión, el tiempo y tratamiento.

Para realizar la verificación, los LESP tienen acceso a muestras de referencia caracterizadas y resguardadas por el InDRE, las cuales podrán solicitar bajo planeación y solicitud oficial previa y deben regresar al terminar del proceso.

Para la verificación de la prueba microscópica es recomendable contar al menos con dos microscopistas con experiencia y realizar el análisis estadístico básico para la verificación:

- **Sensibilidad:** es la probabilidad/habilidad de la prueba para identificar como positiva una muestra que es verdadera positiva (los que tienen la condición). Se expresa en porcentaje.
- **Especificidad:** es la probabilidad/habilidad de la prueba para detectar como negativa una muestra que es verdadera negativa. Se expresa en porcentaje.
- **VPP:** valor predictivo positivo expresa el porcentaje de las muestras verdaderas positivas entre todas las que resultaron positivas en la prueba.
- **VPN:** valor predictivo negativo expresa el porcentaje de las muestras verdaderas negativas entre todas las que resultaron negativas en la prueba.
- **Coeficiente o Índice Kappa:** el índice kappa de Cohen es una medida de la concordancia entre dos observadores y se mide como la razón entre las concordancias observadas y esperadas al azar; y la máxima concordancia posible (100%) y la esperada al azar. Se calcula mediante la siguiente fórmula.

$$K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

Siendo P_o la proporción de acuerdos observados y P_e la proporción de acuerdos esperados en la hipótesis de independencia entre los observadores, es decir, de acuerdos por azar.

Para calcular los parámetros mencionados, se procederá a concentrar los datos en el siguiente cuadro, los cálculos se realizarán mediante el método del cuadro de Punnet 2x2 para aplicar posteriormente las fórmulas de los parámetros correspondientes.

El cálculo de estos parámetros de desempeño se realiza mediante la tabla de 2x2

Estándar de oro (Panel InDRE)

		Positiva	Negativa	Suma
Prueba en evaluación	Positiva	a (verdaderos positivos)	b (falsos positivos)	a + b
	Negativa	c (Falsos negativos)	d (verdaderos negativos)	c + d
	Suma	a + c	b + d	a+b+c+d

1. Sensibilidad = $a/(a+c)$

Especificidad= $d/(b+d)$

2. VPP= $a/(a+b)$

VPN= $d/(c+d)$

CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

De acuerdo con la NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud, el contar con información oportuna y de calidad permite coadyuvar con el Sistema Nacional de Salud, para reforzar las acciones de atención a los problemas sanitarios y factores que condicionen y causen daño a la salud.

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP es indispensable apegar a los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública, componente vigilancia epidemiológica, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad en apego a los requisitos de las normas ISO (International Organization for Standardization) 9001:2015

Sistemas de Gestión de la Calidad e ISO 15189:2022 Requisitos de la calidad y competencia. Además, alinearse a los requisitos establecidos en los lineamientos para el reconocimiento de la competencia técnica en la RNLSP.

Indicadores de calidad en el servicio

Fase preanalítica: Estos indicadores (oportunidad en la toma, el envío y porcentaje de rechazo), comprenden actividades propias del área de vigilancia epidemiológica, que inciden en la calidad de la muestra y el resultado.

- **Oportunidad en el envío:** De acuerdo a los tiempos de oportunidad que establece la estrategia DTI-R donde todo caso probable debe ser detectado y diagnosticado en un plazo de 48 horas ante el inicio de síntomas, el traslado de la muestra al laboratorio no debe exceder un día.
- **Porcentaje de rechazo:** La proporción de rechazos permitida es del $\leq 10\%$. Cuando se registre mayor al 10% del rechazo, el laboratorio debe comunicar al área de vigilancia epidemiológica las oportunidades de mejora con la finalidad de que realicen las acciones conducentes (actualmente el país se encuentra en proceso de eliminación, por lo que las muestras que no cumplan con alguno de los criterios de aceptación, pero representan muestras de alto valor epidemiológico, deben ser analizadas como muestras concesionadas).

Fase analítica: este indicador (estándar del servicio) compete a la RNLSP-paludismo e incide en la obtención de un resultado confiable y oportuno.

- **Estándar del servicio:** El estándar de servicio para la lectura de muestras de diagnóstico es de máximo 24 horas, a partir de que se recibe la muestra en el laboratorio.

Fase posanalítica: (emisión del resultado) compete a la RNLSP-paludismo e incide en el registro oportuno de un resultado en el sistema de vigilancia epidemiológica y la entrega a las partes interesadas.

- **Emisión del resultado:** Una vez obtenido el resultado de casos confirmados se debe informar de manera inmediata a las autoridades correspondientes y se cuenta con ≤ 24 hrs para la entrega del resultado al solicitante del servicio.

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

Para la evaluación de la RNLSP, el InDRE establece indicadores técnico-administrativos que permiten medir la competencia técnica de los laboratorios, cuyos resultados se publican trimestralmente.

Las estrategias de evaluación que se utilizan son: la supervisión indirecta, la supervisión directa y el envío de paneles de evaluación externa del desempeño, de acuerdo a los lineamientos de diagnóstico específico.

Supervisión indirecta

Control de calidad indirecto (CCId): Es la evaluación retrospectiva a nivel del laboratorio evaluador, por parte del LESP a los laboratorios municipales/jurisdiccionales y del InDRE al LESP el cual debe enviar el 100% de muestras positivas y el 10% de muestras negativas, independientemente al estatus de liberación diagnóstica.

Los LESP realizan el control de calidad a sus laboratorios locales y, a su vez, el InDRE lo realiza al LESP verificando los siguientes parámetros:

- Concordancia diagnóstica.
- Identificación de errores de diagnóstico (detección, Identificación de especies y formas parasitarias).
- Calidad de la toma de muestra (gota gruesa y extendido fino).
- Calidad de la tinción (a través del pH de la solución de colorante).

El envío de muestras al InDRE se realiza idealmente por semana epidemiológica, haciendo una evaluación trimestral; en la fecha de corte para esta evaluación se considera toda muestra recibida en la fecha

acordada donde puede entrar toda muestra recibida de esa semana epidemiológica y las de tres semanas anteriores.

El estándar de servicio del control de calidad realizado por el InDRE es de 17 días hábiles.

Supervisión directa

La supervisión directa de la RNLSP consiste en visitas de personal designado por el InDRE a las instalaciones de los LESP y de los LESP a los laboratorios locales, en las que se revisan procesos técnicos y administrativos mediante la aplicación de cédulas específicas.

Ensayos de aptitud

El EApMiVec el cual consiste en un sistema de comparación retrospectivo, periódico y objetivo de los resultados de los diferentes LESP, por medio de un panel de muestras previamente caracterizadas, utilizado como una herramienta de evaluación, para demostrar la competencia técnica de cada uno de los microscopistas que integran la red nacional en la detección de los agentes parasitarios *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania* contribuyendo a mantener y mejorar el diagnóstico del Paludismo, Enfermedad de Chagas y Leishmaniosis respectivamente.

Su objetivo es identificar la capacidad de los laboratorios en el proceso diagnóstico de paludismo y tiene la finalidad de asegurar la estandarización de los procedimientos analíticos utilizados, promover la capacitación y actualización del personal, además de tomar medidas correctivas y de mejora sobre las áreas de oportunidad detectadas.

Composición EApMiVec

El EApMiVec está compuesto por muestras caracterizadas por los Laboratorios de Paludismo, Leishmaniosis y Enfermedad de Chagas, cada laboratorio define de manera independiente el número, así como características de las muestras sujetas a evaluación. En el presente documento, solamente se mencionan las **características de muestras del componente de paludismo**.

Los paneles están conformados por 11 muestras de gota gruesa y frotis, se incluyen positivas a: *Plasmodium vivax* y *P. falciparum* con diferentes grados de formas parasitarias y densidad parasitaria, así como muestras negativas.

Criterios de evaluación

- **Componente de paludismo:** Se evalúan 4 parámetros de manera independiente: **detección** (positivo o negativo); **identificación** (especie correcta); **formas parasitarias**, EAS (estadios asexuales sanguíneos) trofozoítos y esquizontes; ESS (estados sexuales sanguíneos) **y densidad parasitaria** (parásitos totales/microlitro de sangre). Cada parámetro se evalúa con una ponderación máxima de 100%.

NOTA: Se debe realizar densidad parasitaria a toda muestra positiva a *Plasmodium*

Los porcentajes de aceptabilidad para los cuatro parámetros son:

Detección: 95 al 100%

Identificación de especie: 95 al 100%

Estadios parasitarios: 80 al 100%

Densidad parasitaria: 50 al 100% con un intervalo de error de $\pm 25\%$.

La calificación total para paludismo estará compuesta por el promedio de las calificaciones de los tres primeros parámetros evaluados (detección, identificación y formas parasitarias).

- **Componentes de *Leishmania* y Chagas:** Se definen por las áreas correspondientes.

Calificación EApMiVec

- Cada microscopista y laboratorio evaluado obtendrá una calificación por componente (paludismo, Chagas, y *Leishmania*) y la calificación máxima a obtener será de 100% por componente.
- El promedio de las calificaciones obtenidas de todos los microscopistas (por componente) que conforman la red estatal de diagnóstico, será la calificación obtenida en el EApMiVec.

- La calificación obtenida en el EApMiVec se verá reflejada en la Evaluación del desempeño (calificación de paneles) de manera independiente para cada componente diagnóstico.

Envío de paneles por parte del InDRE

- La aplicación del panel se realiza de manera escalonada a las entidades federativas participantes, en tres envíos hasta abarcar la totalidad de los microscopistas de cada red estatal, a través de la Coordinación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (CRNL) del InDRE.
- El envío debe cumplir con las normas de bioseguridad vigentes en el país.
- Los paneles se acompañan de un instructivo (en el que se indican los criterios de evaluación), así como de los formatos correspondientes para su llenado.
- El número de paneles enviados a cada LESP dependerá del número de microscopistas registrados en el estado.
- El LESP se encargará de aplicar el panel a los laboratorios locales.
- Todos los microscopistas deben participar en la evaluación de paneles.
- Todos los microscopistas deben registrar sus resultados en los formatos correspondientes.

Regreso de paneles al InDRE

- El LESP concentrará y enviará los resultados, así como los paneles regresados al InDRE

Los paneles deben ser regresados en las mismas condiciones (triple embalaje) en que son recibidos en cuanto a bioseguridad, limpieza y conservación.

Notificación de resultados por el InDRE

Los resultados obtenidos por cada LESP serán notificados vía oficial, 30 días posteriores a la recepción de los resultados de la evaluación.

En caso de que un microscopista no realice la evaluación y que esta sea justificada, el LESP debe notificar al InDRE en el oficio de envío de resultados con las evidencias necesarias. Se deberá solicitar y reagendar el envío de

panel para su evaluación antes de que finalice el año en curso. Por otro lado, si no se justifica y notifica la omisión, su calificación será cero y será tomada en cuenta en la evaluación del desempeño.

El InDRE elabora un informe comparativo trimestral, con los resultados obtenidos por los laboratorios participantes. En caso de reprogramación de la evaluación de algún microscopista, de manera posterior al periodo reportado, la calificación de este personal, no será considerada en el resultado del laboratorio. La calificación de paneles notificada en el tercer trimestre de la Evaluación del desempeño representa uno de los criterios para obtener o refrendar el reconocimiento de la Competencia técnica de los LESP, por lo que la calificación mínima requerida es de 90%.

Acciones correctivas y de mejora

Tomando en consideración que la calificación mínima aprobatoria de 90% representa un promedio de la red estatal, los LESP deben establecer acciones correctivas dirigidas a los microscopistas que obtuvieron una calificación menor al rango aceptable para cada parámetro evaluado (95 al 100%, en detección e identificación; 80 al 100%, en formas parasitarias; y 50 al 100% en densidad parasitaria) así como acciones de mejora para los microscopistas que obtuvieron calificaciones dentro de los rangos de aceptabilidad.

Las acciones correctivas y de mejora deben ser documentadas en el Sistema de gestión de cada LESP y las evidencias de cumplimiento deben ser enviadas al InDRE, vía electrónica, antes de la siguiente evaluación.

En caso de que un microscopista tenga calificación reprobatoria, este deberá ser re-capacitado tan pronto como sea posible y reevaluado con un nuevo panel, previa solicitud, antes de terminar el año, por lo que no habrá modificación en la evaluación del desempeño del LESP.

CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DEL PALUDISMO

- Mantener una calificación global de la red $\geq$ al 95% en el EApMiVec durante cinco años consecutivos.
- Participar y mantener una concordancia anual $\geq$ al 95% en el control de calidad indirecto.
- Tener una calificación (CCId + EApMiVec) /2 $\geq$ al 95%.
- Contar con al menos un microscopista certificado nivel A en la Evaluación nacional de competencias para microscopistas de malaria (por sus siglas en inglés NCAMM)

Los LESP perderán su liberación diagnóstica cuando ocurra cualquiera de los siguientes escenarios:

- Obtengan calificaciones de dos participaciones consecutivas en el EApMiVec menor al 95%.
- Obtengan concordancias en el control de calidad indirecto menores al 95% al año.
- Tener un promedio anual $<$ al 95% en el (CCId + EApMiVec) /2.
- No contar con un microscopista certificado en el NCAMM.

NOTA: todos los LESP deberán enviar el 10% de muestras negativas y 100% de positivas al InDRE, para su respectivo control de calidad, con independencia al estatus de la liberación diagnóstica.

Incorporación del diagnóstico de paludismo al marco analítico básico (MAB) del LESP.

Los requisitos que debe de cumplir un LESP para la incorporación del diagnóstico de paludismo a su MAB son los siguientes:

- Contar con la infraestructura adecuada para llevar a cabo el diagnóstico microscópico.
- Equipamiento (microscopios) en buenas condiciones, con mantenimiento preventivo/correctivo de forma programada.

- Insumos básicos e indispensables para realizar el diagnóstico microscópico.
- Personal entrenado, capacitado y evaluado al concluir su capacitación.
- Participar en al menos un EApMiVec con calificación dentro de los criterios de aceptabilidad establecidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adak T., Sharma VP and Orlov VS. Studies on the *Plasmodium vivax* relapse Pattern in Delhi, India. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998; 59:175-179.
2. Bunnag D., Karbwang J., Thanavibul A., Chittamas, S., Ratanapongse, Y. and Chalermrut K. et al. High dose of primaquine in primaquine resistant vivax malaria. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1994; 88:218-219.
3. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
4. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
5. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. PHL, CDC, KNCV, RIT. OMS.
http://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/External_Quality_Assessmt_for_AFB_Smear_Microscopy.pdf
6. Frean J. Microscopic determination of malaria parasite load: role of image analysis. Microscopy Science, Technology, Applications and Education. A Méndez-Villas and J. Diaz (Eds), 2010.
7. Gascon, J., Gomez-Arce, J.E., Menendez, C., Valls, M. E. and Corochan M. Poor response to primaquine in two cases of Plasmodium vivax malaria from Guatemala. Trop. Geogr. Med. 1994; 46:32-33.
8. Gogswell F.B. The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria. Clinical Microbiology Reviews, 1992; 5: 26-35.
9. 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>
10. Guidelines for implementation of a quality management system in microscopic diagnosis of malaria. Malaria Light microscopy creating a culture of quality, Venezuela. WHO. 2004.
11. 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.
12. López AF. Diagnóstico microscópico de los parásitos de la malaria en sangre en Diagnóstico de la malaria. Publicación científica No. 512. OPS. 1988 p.p. 39-50.

13. 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.
14. Bases del diagnóstico microscópico del paludismo. Guía del Alumno. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. 2014.
15. Bases del diagnóstico microscópico del paludismo. Guía del Tutor. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. 2014.
16. Manual de Procedimientos Operativos Estándar para el diagnóstico de Malaria. 2da. Edición. Secretaría de Salud de Honduras. 2012.
17. Manual de aseguramiento de la calidad del diagnóstico microscópico del paludismo, 2a ed. Organización Mundial de la Salud.
18. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. MMWR Surveill Summ. 6; 61:1-102; 2012.
19. Muhlberger N, Jelinek T, Gascon J, Probst M, Zoller T. et al. 2004. Epidemiology and clinical features of vivax malaria imported to Europe: Sentinel surveillance data from Trop Net Europ. Malaria Journal. 2004; 3:1-71.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la Vigilancia Epidemiológica.
21. Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.
22. Pan American Health Organization. External Quality assurance program for malaria microscopy diagnosis, 2010.
23. Pérez H.A. El Paludismo por Plasmodium vivax y los desafíos del tratamiento adecuado y oportuno. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. 2004; 54, 1:1-8.
24. Rodríguez MH; "Paludismo". Quinta Unidad. Enfermedades Parasitarias. Enfermedades Tropicales en México. Capítulo 2: pp267-275.
25. World malaria report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence:
26. CC BY-NC-SA 3.0 IGO. World Health Organization. Basic malaria microscopy- 2 Edition. Part 1: Learner's guide 2010.
27. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
28. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2004.
29. World Malaria Report: time to acknowledge *Plasmodium knowlesi* malaria. Bridget E. Barber Email author View ORCID ID profile, Giri S. Rajahram, Matthew J. Grigg, Timothy William and Nicholas M. Anstey. Malaria Journal 2017;16:135. DOI: 10.1186/s12936-017-1787-y.

ANEXOS

Anexo I: Bioseguridad en el laboratorio

Aquí se describe el nivel de bioseguridad en el laboratorio para el procesamiento de las muestras. Haciendo referencia a los lineamientos de gestión del riesgo biológico del InDRE.

- El laboratorio o lugar de trabajo debe disponer de una zona limpia y ordenada, sin polvo y con espacio suficiente (2m² por analista de acuerdo a la NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos).
- Limpiar o descontaminar superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 0.1% o alcohol etílico al 70% al final de la jornada de trabajo (en caso de derrame de sangre utilizar solución de hipoclorito de sodio al 1%).
- Rotular adecuadamente reactivos y colorantes a utilizar con nombre y fecha en la que se ha preparado o abierto la solución, así como fecha de caducidad (cuando aplique).
- Lavar con detergente todo material de vidrio y de otro tipo que se vaya a reutilizar (como charolas de tinción) y enjuagarlos con suficiente agua.
- Guardar material en cajones o cajas, debidamente rotulados y mantenerlos en zonas limpias, sin polvo y libres de insectos.
- El metanol (alcohol metílico) es inflamable y muy tóxico si se inhala o se ingiere; por vía oral, aún cantidades muy pequeñas pueden causar ceguera e incluso la muerte. Evitar ponerse en contacto con esta sustancia o inhalarla. Cuando no se esté utilizando, el metanol deberá permanecer guardado en un gabinete, preferentemente cerrado con llave, en áreas bien ventiladas.
- Todo el personal de laboratorio y sobre el terreno debe dar por sentado que todas las muestras humanas son potencialmente infecciosas y observar siempre las precauciones universales para no exponerse a contraer infecciones transmitidas por la sangre.
- Es indispensable observar las precauciones universales, que comprenden el uso del equipo de protección personal, como guantes, bata de laboratorio y en caso necesario goggles de protección.

Anexo II: Procedimientos operativos estandarizados para el diagnóstico de paludismo

1. Limpieza y conservación de los portaobjetos para microscopía

Introducción: Los portaobjetos de vidrio utilizados en microscopía se suministran generalmente en cajas de 50 unidades. En la etiqueta de la caja pueden aparecer descritos como «lavados» o «limpios». Para el diagnóstico microscópico del paludismo es preciso que los portaobjetos de vidrio sean de calidad «superior», con los bordes pulidos y una banda mate para rotular la muestra. El vidrio de los portaobjetos de calidad «superior» no se empaña ni se vuelve opaco en las condiciones de trabajo de las zonas tropicales. Los portaobjetos de vidrio de calidad inferior son más baratos, pero se deterioran rápidamente en los climas cálidos y húmedos; el lavado no elimina las manchas opacas y los portaobjetos se vuelven inutilizables para un diagnóstico microscópico preciso. El hecho de que la etiqueta indique que los portaobjetos están «lavados» o «limpios» no siempre significa que se puedan utilizar directamente al sacarlos de la caja. Es indispensable lavar, secar y envolver los portaobjetos antes de utilizarlos para preparar las extensiones de sangre.

Es importante comprobar que los portaobjetos que se van a utilizar están limpios y sin rayaduras. Si están sucios y rayados, puede que no se logre preparar adecuadamente la extensión de sangre y ello afecte a la calidad y la integridad del diagnóstico.

Objetivo: Describir el procedimiento para seleccionar, limpiar, envolver y guardar correctamente los portaobjetos con los que se prepararán las extensiones de sangre destinadas al diagnóstico microscópico del paludismo.

Alcance: Esta actividad se debe realizar por los microscopistas de los laboratorios que realicen toma de muestra o como apoyo al personal de programa, siempre y cuando su carga de trabajo lo permita, es decir, que no se comprometa la oportunidad diagnóstica y cuando los portaobjetos nuevos no se encuentren lavados o limpios. Por otro lado, en condiciones de toma de búsqueda activa y pasiva en campo y en las unidades médicas que no permita utilizar laminillas lavadas, el portaobjetos se deberá limpiar con

una torunda alcoholada y secado con una torunda limpia sin alcohol, evitando dejar residuos en la superficie de la laminilla.

Materiales:

- Portaobjetos de calidad “superior” idealmente lisos.
- Dos palanganas de plástico de tamaño mediano.
- Detergente líquido.
- Trapo de limpieza o esponja suave.
- Paños de algodón limpios que no dejen pelusa.
- Agua limpia.
- Hojas de papel limpio cortadas en rectángulos de 11x 15 cm.
- Cajas de portaobjetos vacías (las mismas donde se empaclaron los portaobjetos nuevos).
- Cinta adhesiva transparente (tipo Diurex).
- Ligas.
- Mueble para almacenar laminillas lavadas y empaquetadas (ambiente fresco y seco).

Procedimiento:

1. Utilizar guantes para evitar cortarse o lesionarse con los portaobjetos de vidrio al lavarlos. Todos los portaobjetos rotos deben depositarse en un recipiente para material punzocortante diseñado para tal efecto.
2. Separar los portaobjetos nuevos unos de otros y dejarlos sumergidos en detergente líquido entre 4 y 8 horas, o toda la noche para mayor comodidad.
3. Lavar por ambos lados, frotando las superficies respectivas con la esponja, sujetándolos entre el índice y el pulgar.
4. Secar los portaobjetos uno por uno con un paño de algodón. Los portaobjetos despotillados o rayados no sirven para el diagnóstico microscópico del paludismo, por lo que deben desecharse.
5. Envolver los portaobjetos secos de diez en diez en las hojas de papel limpio. Doblar hacia abajo los extremos del papel, sujetarlos con cinta adhesiva transparente y colocar los paquetes en cajas de portaobjetos vacías; los portaobjetos ya están listos para su uso. Asegure las cajas con una liga.
6. Con fines de control de calidad, identificar las cajas con un marcador, anotando la fecha, el número de caja, número de portaobjetos y nombre o iniciales de la persona que realizó el lavado.

7. Guardar los portaobjetos limpios en sus cajas, dentro de un mueble y en un ambiente fresco y seco, ya que, con temperaturas y humedad elevadas se adherirán unos a otros al cabo de semanas, o se pueden contaminar con hongos y quedarán inutilizados, salvo que se laven y sequen de nuevo.

Nota: No reutilizar ni reciclar los portaobjetos, desechar portaobjetos despostillados o rayados. Utilizar portaobjetos que se limpiaron hace tiempo, es decir, no los más recientes.

2. Toma de muestra sanguínea por venopunción y preparación de gota gruesa y frotis a partir de sangre venosa recolectada en tubo con EDTA

Introducción: En algunas ocasiones, las unidades de atención médica, recolectan muestras de sangre venosa para realizar diversos análisis, uno de los cuales puede ser el diagnóstico microscópico del paludismo. Se recolectan volúmenes de sangre venosa mayores que en las muestras obtenidas por punción dactilar, y se conservan en tubos que contienen un anticoagulante (preferiblemente ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]). Se pueden utilizar muestras de sangre venosa tratadas con EDTA para preparar extensiones de sangre finas y gruesas con las que llevar a cabo el diagnóstico microscópico del paludismo siguiendo los procedimientos descritos en el presente documento.

Objetivo: Describir el procedimiento de toma de muestra sanguínea por venopunción para la elaboración de gota gruesa y frotis

Alcance: Para el personal de salud que realice la toma de muestra por venopunción.

Materiales:

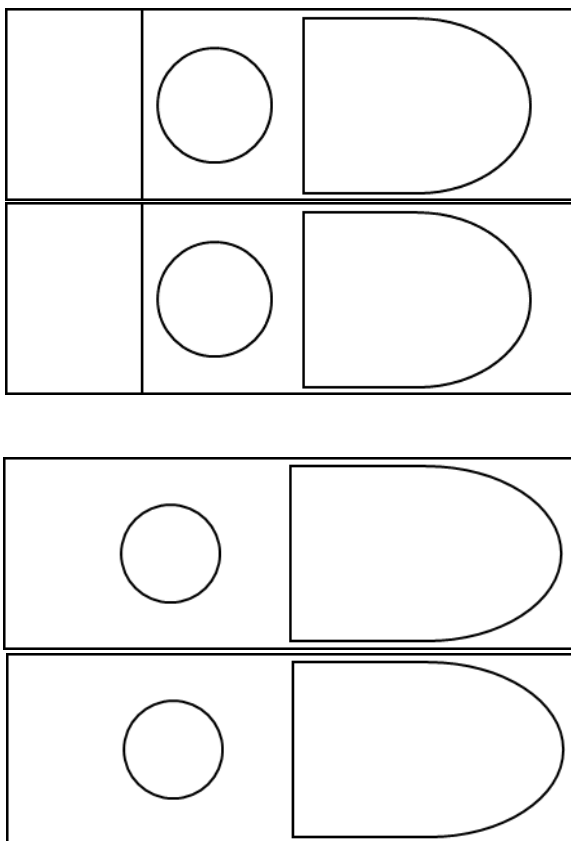
Portaobjetos de vidrio limpios y de buena calidad de 25x75mm idealmente lisos y bordes pulidos (en caso de contar con portaobjetos con un lado esmerilado, no colocar la muestra en este sitio).

- Sistema Vacutainer® o jeringa de 5 ml con aguja calibre 21-23
- Tubo de 4-5 ml con anticoagulante EDTA
- Etanol al 70%
- Algodón absorbente (torundas)
- Guantes de látex o nitrilo
- Recipiente rígido para residuos infecciosos
- Micropipeta y puntas

- Plantilla de gota gruesa y frotis
- Lápiz de grafito o lápiz diamante

Procedimiento:

1. Rotular tubo que contenga EDTA con el nombre del paciente más la fecha y la hora a la que se toma la muestra.
2. Colocar un torniquete en el brazo del paciente (por encima del codo) para hacer visibles o palpables las venas. Pídale al paciente que cierre el puño con fuerza para que estas se vuelvan más prominentes.
3. Palpar con el dedo índice para encontrar una vena de calibre suficientemente grande y con una movilidad mínima.
4. Desinfectar la zona con una toallita o un algodón humedecido con alcohol isopropílico o etílico al 70%. No vuelva a tocar la zona que ha limpiado.
5. Dejar que la zona de la venopunción se seque al aire para que la muestra de sangre extraída no se contamine con el alcohol.
6. Introducir una aguja de flebotomía estéril y de un solo uso (unida a una jeringuilla o a un tubo al vacío) a lo largo de la vena, con el bisel dirigido hacia arriba. Extraiga de manera uniforme entre 2 mL y un máximo de 4 mL de sangre. *Nota: Los anticoagulantes pueden interferir en la adherencia de la sangre al portaobjetos y en la tinción de Giemsa, sobre todo cuando la proporción entre sangre y anticoagulante no es óptima. Por ello, en un tubo de 5 ml, el volumen de sangre debería superar los 2 ml.*
7. Cuando haya recolectado un volumen suficiente de sangre, soltar el torniquete y pedir al paciente que abra el puño. Extraer la aguja y con un algodón presionar firmemente sobre el lugar de la venopunción. Pedir al paciente que siga presionando en ese mismo punto con el brazo en alto hasta que deje de sangrar.
8. Transferir la sangre al tubo que contiene EDTA y mezcle ambos despacio invirtiendo el tubo seis veces. No agitar el tubo.
9. Mezclar despacio la sangre venosa recolectada en un tubo al vacío que contenga EDTA.
10. Colocar un portaobjetos limpio y rotulado sobre una plantilla normalizada para la preparación de gotas gruesas.



11. Con una micropipeta con la punta montada, transferir 6 μ l de sangre al círculo más grande del portaobjetos (para la gota gruesa) y 3 μ l sobre el círculo pequeño (para el frotis).
 - a. Para preparar el frotis:
 - i. Colocar el borde de un portaobjetos “extensor” limpio por delante de la gota de sangre colocada sobre el círculo pequeño de la plantilla formando un ángulo de 45°.
 - ii. Desplazar lentamente el “extensor” hacia atrás hasta que entre en contacto con la gota de sangre y dejar que se extienda a lo largo del borde del “extensor”.
 - iii. Deslizar rápidamente el “extensor” hacia adelante (alejándose del centro) con un movimiento uniforme y continuo.
 - b. Para prepara la gota gruesa:
 - i. Con la esquina del portaobjetos “extensor” distribuir con 3-6 movimientos rápidos y suaves la gota de sangre hasta formar un círculo de aproximadamente 1 cm de diámetro

(también se pueden realizar los movimientos para formar un cuadro de 1 cm por lado).

12. Dejar secar las extensiones en horizontal. La sangre tratada con EDTA presenta problemas de adherencia. Si necesita secar rápidamente las extensiones, utilice un secador de pelo desde una cierta distancia y a una temperatura moderada. No coloque las extensiones de sangre demasiado cerca de la fuente de calor, ya que este podría fijarlas.

Notas:

- Colocarse guantes de látex antes de tomar muestras de sangre, por seguridad.
- La sangre extraída no debe conservarse más de 8 horas en tubos que contengan EDTA antes de preparar las extensiones finas y gruesas, ya que el anticoagulante afectará a la morfología del parásito, *por lo que, si la sangre venosa se extrae fuera del laboratorio en el que se van a preparar las extensiones gruesas y finas, es indispensable trasladarla de inmediato a dicho laboratorio, si no se tiene la certeza de la oportunidad del envío y recepción del tubo, la preparación de gota gruesa y frotis se deberá realizar por la persona que realizó la venopunción en la unidad y realizar el envío de la muestra hemática sobre el portaobjetos el mismo día.*
- Las gotas gruesas deben secarse en horizontal y resguardadas del polvo y las moscas.
- Las gotas gruesas podrían autofijarse si quedan expuestas a un calor extremo, por lo que es preciso teñirlas de inmediato.
- Las gotas gruesas se pueden secar suavemente con un secador de pelo a temperatura templada o mediante algún otro método, pero hay que evitar que las muestras se fijen por el calor, cosa que puede ocurrir con rapidez.
- No utilice un bolígrafo de tinta ordinaria ni de gel para rotular los portaobjetos, ya que la tinta se difundirá cuando se fije la extensión.
- Si la extensión se ha hecho correctamente, quedará poca sangre en el extensor, de modo que este podrá servir de portaobjetos de soporte para las extensiones fina y gruesa del paciente siguiente, en las que se utilizará como extensor un portaobjetos limpio sacado de la caja.

3. Preparación de la solución madre de colorante de Giemsa

Introducción: El colorante de Giemsa es el más utilizado en la tinción de extensiones de sangre para el diagnóstico del paludismo. A pesar de que en nuestro país se utiliza la solución comercializada lista para su uso, en este procedimiento se describe la manera de preparar la solución madre de Giemsa a partir de polvo comercial.

Objetivo: Describir el procedimiento para preparar la solución madre de Giemsa a partir de polvo comercial.

Alcance: De conocimiento para todos los microscopistas de los laboratorios locales, estatales y de referencia que tengan la necesidad de elaborar colorante a partir de polvo, ya que, en nuestro país, se utiliza la solución madre comercial, aunque su calidad varía con el fabricante (Hycel, Sigma o Merck).

Materiales:

- Colorante Giemsa en polvo certificado.
- Alcohol metílico puro, de alta calidad y sin acetona.
- Glicerol puro de alta calidad.
- 50-100 perlas de vidrio de 3-5mm de diámetro.
- Espátula o cuchara dosificadora.
- Charola o papel para pesar.
- Probetas graduadas de 250 mL.
- Embudo de vidrio o plástico
- Frasco limpio y seco oscuro o ámbar con tapón de rosca de 500 mL de capacidad.
- Balanza analítica

Procedimiento:

Para preparar 500 mL de colorante madre Giemsa:

1. Introducir 50-100 perlas de vidrio limpias en un frasco obscuro o ámbar.
2. Pesar 3.8 g de colorante de Giemsa en polvo con una balanza analítica y mediante un embudo verterlo en el frasco que contiene las perlas.
3. Verter lentamente 100 mL de metanol, arrastrando todos restos de colorante seco en el embudo.
4. Cerrar el frasco con el tapón de rosca y agitar el frasco con movimientos circulares fuertes durante 2 o 3 minutos, para disolver los cristales de colorante.
5. Añadir 250 mL de glicerol al frasco, con ayuda del embudo y agitar nuevamente de 3 a 5 minutos.
6. Añadir a la mezcla los 150 ml restantes de metanol arrastrando los residuos de glicerol en el embudo.
7. Cerrar perfectamente el tapón de rosca del frasco.
8. Durante el primer día, agitar la mezcla alrededor de seis veces al día durante 2-3 minutos cada vez.

9. Rotular el frasco con el número de lote, nombre de la persona que preparó la solución madre, fecha de preparación y de caducidad cuando aplique, documentar en una bitácora la preparación del reactivo.
10. Dejar “madurar” el colorante durante dos semanas mezclando en varias ocasiones en el día.
11. Ya madurada la solución, filtrar pequeñas cantidades de colorante utilizando papel Whatman grado 1, manteniendo en un frasco de color ámbar de menor volumen y el colorante estará listo para ser utilizado.

Notas:

- El frasco debe estar siempre muy bien cerrado para evitar la absorción de vapor de agua y evaporación del metanol/oxidación del colorante.
- Guardar el colorante en un lugar fresco, seco y protegido de la luz. Si utiliza un frasco transparente para guardar la solución madre, envolverlo en un papel grueso oscuro que no deje pasar la luz.
- No agitar el frasco con colorante al menos 24 horas antes de utilizar la solución, para evitar resuspender el precipitado que afecta la muestra sanguínea durante su tinción.
- No contaminar la solución madre de Giemsa con agua, la más mínima cantidad la deteriora y la tinción será cada vez más ineficaz.
- Filtrar pequeñas cantidades de colorante, disminuye la probabilidad de contaminar la solución madre.
- No introducir o utilizar pipetas sucias o húmedas dentro de la solución madre de Giemsa.
- No verter el colorante sobrante o sin usar en el frasco de la solución madre ni en el frasco de la solución de trabajo, el colorante debe utilizarse rápidamente o desecharse.

4. Verificación del control de calidad de la solución madre de Giemsa

Introducción: La supervisión de la funcionalidad de los reactivos se conoce como “control de la calidad” (CC). Para diagnosticar correctamente el paludismo es fundamental teñir las extensiones de sangre con preparaciones de solución madre de colorante de Giemsa y de solución amortiguadora de pH 7.2 que sean de buena calidad. Es preciso comprobar la funcionalidad de estas soluciones antes de usarlas y, como buena práctica, debe llevarse a cabo una verificación de CC en el siguiente caso:

- En cada lote nuevo de solución madre que se prepare o se abra (solución comercial lista para uso).

Es ideal comprobar la calidad del colorante en una extensión de sangre que se sepa que es positiva. Si no se dispone de una extensión de sangre positiva para paludismo, se puede utilizar una muestra negativa para examinar el color de los elementos formes de la sangre.

Resultados esperados: En el caso del colorante, deberá comprobarse la funcionalidad de la solución de trabajo al 3% y la solución de trabajo al 10%. Los eritrocitos se verán de color gris rosáceo, las plaquetas aparecerán de color rosa oscuro, y los leucocitos (linfocitos, neutrófilos y monocitos) tendrán un núcleo de color azul morado y un citoplasma pálido. Los eosinófilos contendrán gránulos gruesos de color rojo púrpura intenso en el citoplasma, y los neutrófilos presentarán unos gránulos más finos de color morado. En los eritrocitos no infectados, el punteado basófilo se verá azul. Los colores mencionados pueden variar ligeramente según el lote de colorante utilizado y la naturaleza de la sangre en sí.

Los plasmodios tendrán un núcleo rojo o rosa y un citoplasma azul. Si se utilizan extensiones con *P. vivax*, los gránulos de Schüffner se verán como un tapiz uniforme de puntos de color rosa en el citoplasma de los eritrocitos. Si se utilizan extensiones con *P. falciparum*, las hendiduras de Maurer aparecerán como corpúsculos gruesos, distribuidos de manera irregular en el citoplasma de los eritrocitos.

Debe determinarse el tiempo óptimo de tinción para cada lote nuevo de solución madre de colorante de Giemsa. Si la tinción de la extensión de sangre queda demasiado oscura o demasiado clara, se puede corregir ajustando el tiempo de tinción. Por ejemplo, si las células se ven pálidas y el punteado es débil, probablemente haga falta una tinción más larga para obtener el resultado correcto. Se debe anotar el tiempo ajustado en el libro de registro del CC y utilizarlo para ese lote de solución madre de colorante.

Objetivo: Describir el procedimiento de evaluación del control de la calidad (CC) de la solución madre de colorante de Giemsa.

Alcance: Para todos los laboratorios que realicen la tinción de Giemsa.

Materiales:

- Laminillas con gota gruesa y frotis
- Solución madre de Giemsa
- Solución amortiguadora pH 7.2
- Charola de tinción
- Cronómetro

- Material volumétrico
- Metanol
- Microscopio
- Aceite de inmersión

Procedimiento:

1. Preparar algunas muestras de gota gruesa y frotis (idealmente positivas).
2. A partir de la nueva solución madre de Giemsa, preparar dos soluciones de trabajo, una al 3% y otra al 10% utilizando solución amortiguadora pH 7.2
3. Fijar el frotis con metanol y esperar a que se seque.
4. Teñir una muestra mediante tinción rápida (solución al 10%) y otra con tinción lenta (al 3%).
5. Examinar las muestras (idealmente el frotis) para comprobar la calidad de la tinción.
6. Si es necesario, ajustar el tiempo de tinción y repetir los pasos 1 a 4 hasta obtener los resultados esperados.
7. Documente los datos, resultados, observaciones y conclusiones.

Notas :

- En las pruebas para determinar el tiempo óptimo de tinción se pueden teñir varios portaobjetos simultáneamente, pero durante un tiempo distinto. Por ejemplo, se pueden teñir simultáneamente tres portaobjetos con el colorante al 10% dejándolos 8, 9 y 10 minutos, y el tiempo de tinción que ofrezca los mejores resultados será el elegido para ese lote de solución madre de colorante de Giemsa.
- En el examen macroscópico, la extensión de sangre debe ser de color gris azulado. Un color rojo rosado es signo de una tinción incorrecta (demasiado ácida).

5. Preparación de la solución de trabajo de colorante de Giemsa

Introducción: Para lograr una tinción óptima de las extensiones de sangre en el diagnóstico microscópico del paludismo se recomienda utilizar una solución de trabajo de colorante de Giemsa recién preparada, a partir de una solución madre correctamente elaborada y diluida con una solución amortiguadora de pH 7.2.

La tinción con colorante de Giemsa se puede llevar a cabo por un **método rápido (con una solución de trabajo al 10%)** o **lento (con una solución de trabajo al 3%)**. El método rápido se utiliza en los laboratorios con mucha carga de trabajo en los que es fundamental un diagnóstico rápido para atender a los pacientes. El método lento se utiliza para teñir un gran número de muestras, como las recolectadas en búsqueda en campo.

Debe determinarse el tiempo óptimo de tinción para cada lote nuevo de solución madre de colorante de Giemsa. Si la tinción de la extensión de sangre queda demasiado oscura o demasiado clara, se puede corregir ajustando el tiempo de tinción. Por ejemplo, si las células se ven pálidas y el punteado es débil, probablemente haga falta una tinción más larga para obtener el resultado correcto. Se debe documentar el tiempo ajustado y utilizarlo para ese lote de solución madre de colorante.

Objetivo: Describir el procedimiento de preparación de una solución de trabajo de colorante de Giemsa a partir de la solución madre para la tinción sistemática de extensiones de sangre en el diagnóstico microscópico del paludismo.

Alcance: Para todos los laboratorios que realicen el diagnóstico microscópico de paludismo.

Materiales:

Solución de trabajo de colorante de Giemsa al 10%

- Colorante de Giemsa filtrado y transferido a partir de la solución madre a un frasco de 20 o 50 ml.
- Solución amortiguadora pH 7.2
- Vaso de precipitados, frasco, probeta o tubo limpio de 10-25 mL
- Pipeta Pasteur o de transferencia
- Papel Whatman grado 1

Solución de trabajo de colorante de Giemsa al 3%

- Colorante de Giemsa filtrado y transferido a partir de la solución madre a un frasco de 20 o 50 ml.
- Solución amortiguadora pH 7.2
- Probeta graduada limpia de 100-500 mL
- Pipeta Pasteur o de transferencia o piseta
- Papel Whatman grado 1

Procedimiento:

Solución de trabajo de colorante de Giemsa al 10% (tinción rápida utilizada para teñir entre 1 y 15 preparaciones, para cada portaobjetos se necesitan aproximadamente 4 mL de colorante)

1. Verter 9 mL de solución amortiguadora en un vaso, probeta o tubo limpio.
2. Añadir 1 mL de solución madre de Giemsa filtrada y alicuotada. No tome el colorante directamente del frasco grande para evitar que se contamine.
3. Mezclar suavemente la solución de trabajo.
4. Utilizar el colorante en los 15 minutos posteriores a haberlo preparado y deseche el sobrenadante.

Solución de trabajo de colorante de Giemsa al 3% (tinción lenta utilizada para teñir más de 20 preparaciones, para cada portaobjetos se necesitan aproximadamente)

1. Verter 97 mL de solución amortiguadora en una probeta graduada limpia.
2. Añadir 3 mL de solución madre de Giemsa filtrada y alicuotada. No tome el colorante directamente del frasco grande para evitar que se contamine.
3. Mezclar suavemente la solución de trabajo.
4. Utilizar el colorante en los 15 minutos posteriores a haberlo preparado y deseche el sobrenadante.

Notas:

- Las probetas graduadas, las pipetas, los recipientes y los tubos de ensayo deben estar limpios y secos antes de su uso.
- No prepare un único lote de colorante de Giemsa para utilizarlo o reutilizarlo a lo largo del día o durante más tiempo. El colorante de Giemsa absorbe con rapidez el vapor de agua contenido en el aire, y cuando se diluye con agua desionizada, destilada o de cualquier otro tipo, pierde rápidamente sus propiedades tintoriales, por lo que al cabo de muy poco tiempo la tinción de las extensiones es deficiente. La película irisada que se forma en la superficie del colorante de Giemsa preparado se adhiere fácilmente a la extensión de sangre y dificulta la identificación de las estructuras

Cálculo del volumen de solución madre de colorante de Giemsa y solución amortiguadora necesario para la tinción de portaobjetos uno por uno.

Para cada portaobjetos se necesitan 4 mL de solución de trabajo de colorante de Giemsa. En consecuencia, la fórmula que se ofrece a continuación permite calcular el volumen de solución madre de colorante de Giemsa necesario para teñir los portaobjetos uno por uno:

$$\begin{aligned} & \text{Volumen de solución madre de Giemsa por muestra (ml)} \\ &= \frac{\text{Concentración de colorante necesaria} \times 4 \text{ ml}}{100} \end{aligned}$$

La cantidad de solución amortiguadora (pH 7.2) necesaria para teñir un solo portaobjetos se puede calcular como se indica a continuación:

$$\begin{aligned} & \text{Volumen de solución amortiguadora por muestra (ml)} \\ &= 4 - \text{Volumen de solución madre de Giemsa por muestra (ml)} \end{aligned}$$

Los 4 mL de solución de trabajo de colorante de Giemsa se preparan añadiendo el volumen de solución madre de colorante de Giemsa necesario para cada portaobjetos más el volumen calculado de solución amortiguadora a pH 7,2 necesario para cada portaobjetos.

Ejemplo 1: Tinción de 15 muestras con solución de colorante de Giemsa al 10%

$$\text{Volumen de solución madre de Giemsa por muestra (ml)} = \frac{10 \times 4 \text{ ml}}{100} = 0.4 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen de solución madre de Giemsa por 15 muestras (ml)} = 0.4 \text{ ml} \times 15 = 6 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen de solución amortiguadora por muestra (ml)} = 4 - 0.4 = 3.6$$

$$\text{Volumen de solución amortiguadora por 15 muestras (ml)} = 3.6 \times 15 = 54 \text{ ml}$$

Por consiguiente, se deben mezclar 6 mL de solución madre de colorante de Giemsa con 54 mL de solución amortiguadora para preparar la cantidad de solución de trabajo de colorante de Giemsa al 10% necesaria para teñir 15 muestras.

Ejemplo 2: Tinción de 50 muestras con solución de colorante de Giemsa al 3%

$$\text{Volumen de solución madre de Giemsa por muestra (ml)} = \frac{3 \times 4 \text{ ml}}{100} = 0.12 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen de solución madre de Giemsa por 50 muestras (ml)} = 0.12 \text{ ml} \times 50 = 6 \text{ ml}$$

$$\text{Volumen de solución amortiguadora por muestra (ml)} = 4 - 0.12 = 3.88$$

$$\text{Volumen de solución amortiguadora por 50 muestras (ml)} = 3.88 \times 50 = 194 \text{ ml}$$

Por consiguiente, se deben mezclar 6 mL de solución madre de colorante de Giemsa con 194 mL de solución amortiguadora, para preparar la cantidad

de solución de trabajo de colorante de Giemsa al 3% necesaria para teñir 50 muestras.

6. Preparación de soluciones amortiguadoras.

Introducción: El pH representa el grado de acidez (<7) o alcalinidad (>7) de un líquido, siendo el valor de 7 la neutralidad. El agua se puede acidificar o alcalinizar agregando soluciones de sales amortiguadoras que evitan cambios bruscos en el pH.

Para poder observar todas las características tintoriales de los plasmodios es necesario preparar la solución de trabajo de Giemsa con soluciones amortiguadoras, las cuales deben ser guardadas de forma correcta para que no absorban humedad del ambiente.

Por otra parte, existen en el mercado pastillas amortiguadoras que brindan un determinado pH cuando se mezclan, por lo general, en un litro de agua, no es necesario pesarlas y se recomienda su uso en aquellos lugares donde no se cuenta con el material necesario para preparar las soluciones a partir de sales independiente. De igual manera, se deben resguardar en un lugar limpio y seco.

Objetivo: Describir el procedimiento de preparación de soluciones amortiguadoras útiles en el diagnóstico de paludismo.

Alcance: Para todos los laboratorios que realicen el diagnóstico microscópico de paludismo.

Materiales:

- Fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4)
- Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)
- Agua destilada
- Probetas de 1000 mL
- Frascos de tapa hermética de 1000 mL
- Balanza de precisión
- Charolas para pesaje

Procedimiento:

Solución amortiguadora “A” (solución ácida)

1. Pesar 9.2 g de C y disolverlos en una pequeña cantidad de agua destilada (esta sal se puede sustituir por fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)).
2. Una vez disuelta agregar agua destilada hasta completar 1000 mL
3. Vaciar la solución en un frasco de tapa hermética y rotular (nombre de la solución, nombre de quien preparó y fecha de elaboración).

Solución amortiguadora “B” (solución alcalina)

1. Pesar 9.5 g de Na_2HPO_4 y disolverlos en una pequeña cantidad de agua destilada.
2. Una vez disuelta agregar agua destilada hasta completar 1000 mL
3. Vaciar la solución en un frasco de tapa hermética y rotular (nombre de la solución, nombre de quien preparó y fecha de elaboración).

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2

1. Mezclar 28 mL de solución ácida (NaH_2PO_4) con 72 mL de solución alcalina (Na_2HPO_4) en un frasco de 1 L con tapa hermética
2. Agregar 900 mL de agua destilada y mezclar perfectamente
3. Identificar la solución (nombre de la solución, nombre de quien preparó y fecha de elaboración) y guardarla en un lugar limpio y seco.

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 a partir de pastilla comercial

1. Tomar una pastilla de regulador de fosfatos pH 7.2 con ayuda de unas pinzas o con las manos cubiertas con un guante.
2. Disolver la pastilla en un litro de agua destilada y mezclar perfectamente.
3. Vaciar la solución preparada en un frasco de tapa hermética
4. Identificar la solución (nombre de la solución, nombre de quien preparó y fecha de elaboración) y guardarla en un lugar limpio y seco.

Notas:

- Las probetas graduadas, frascos y todo el material volumétrico utilizado deben de estar limpios y secos antes de su uso.

7. Tinción de gota gruesa y frotis con Giemsa para el diagnóstico microscópico de paludismo.

Introducción: En el diagnóstico del paludismo es crucial que la gota gruesa y frotis de sangre estén correctamente teñidos para poder identificar con exactitud las especies parasitarias. El uso de colorante de Giemsa es el procedimiento recomendado y más fiable para teñir las extensiones de sangre gruesas y finas. La solución de Giemsa se compone de eosina y azul de metileno (azur). La eosina tiñe de rojo el núcleo del parásito, y el azul de metileno tiñe de azul el citoplasma. La extensión fina se fija con metanol. La deshemoglobinización de la gota gruesa y la tinción se producen al mismo tiempo. El pH idóneo para poner de manifiesto el punteado de los parásitos que permite la correcta identificación de las especies es 7.2.

Método rápido (solución de trabajo de colorante al 10%)

Es el método más utilizado para teñir entre 1 y 15 extensiones a la vez. Se utiliza cuando es fundamental un diagnóstico rápido para atender a los pacientes.

Método lento (solución de trabajo de colorante al 3%)

El método lento se utiliza para teñir un gran número de muestras, como las recolectadas en búsqueda en campo.

Objetivo: Describir el procedimiento para teñir correctamente con colorante de Giemsa las extensiones de sangre destinadas al diagnóstico microscópico del paludismo.

Alcance: Para todos los microscopistas de los laboratorios que realicen el diagnóstico microscópico de paludismo

Materiales:

- Solución de colorante de Giemsa al 10 % (para tinción rápida) o al 3% (para tinción lenta).
- Metanol absoluto libre de acetona.
- Solución amortiguadora pH 7.2.
- Vaso o recipiente pequeño para el metanol.
- Vaso de precipitados, piseta, probeta o recipiente para solución de trabajo de colorante.
- Cronómetro
- Gradilla para secar las muestras

- Gradilla, puente, o charola de tinción
- Pipeta Pasteur o pipeta de transferencia

Procedimiento:

1. Calcular la cantidad de solución de trabajo de colorante de Giemsa al 10% o 3% que se necesitará para el número de portaobjetos que se van a teñir.
2. Fijar el frotis sumergiéndolo 1-2 segundos en un recipiente pequeño con metanol absoluto. *No permitir que la gota gruesa entre en contacto con el metanol, ya que este y sus vapores la fijarían rápidamente y ello interferiría en la hemólisis de dicha gota gruesa.*
3. Colocar el portaobjetos de manera horizontal en una bandeja o una gradilla de secado sobre una superficie plana. *Nunca deje secar los portaobjetos en vertical con la extensión fina abajo, ya que los vapores de metanol pueden fijar la gota gruesa.*
4. Dejar secar las muestras hasta que el metanol se evapore completamente (1-2 minutos).
5. Colocar los portaobjetos con las extensiones que va a teñir orientadas hacia abajo en caso de utilizar una charola para tinción inversa o hacia arriba si está utilizando una gradilla, rejilla o puente de tinción.
6. Verter el colorante lentamente entre los portaobjetos y la bandeja de tinción si está tiñendo extensiones colocadas boca abajo, hasta que todos los portaobjetos queden cubiertos con el colorante, o verter lentamente el colorante por encima de los portaobjetos si las extensiones están boca arriba sobre un soporte de tinción.
7. Dejar teñir las preparaciones durante 8-10 minutos (tinción rápida) o durante 30-45 minutos (tinción lenta) de acuerdo a la verificación del colorante realizada previamente en cada cambio de lote.
8. Al término del tiempo de coloración, extraer los portaobjetos uno por uno y enjuagar suavemente las muestras sumergiéndolas en un recipiente con solución amortiguadora pH 7.2
9. Desechar la solución sobrante de colorante de Giemsa.

Notas:

- **Secado de las gotas gruesas:** *Las gotas gruesas deben estar completamente secas antes de teñirlas. Se pueden secar rápidamente con el aire templado de una secadora de cabello. No calentar en exceso las extensiones, ya que podrían fijarse por el calor y no teñirse correctamente.*
- **Uso de la solución amortiguada para enjuagar los portaobjetos:** *El pH del agua utilizada para enjuagar es importante, ya que, si es ácida, puede alterar el color de las extensiones. Por consiguiente, se recomienda enjuagar los portaobjetos con la*

*misma solución amortiguadora utilizada para la tinción, cuyo pH es de 7.2, en laboratorios lejanos que no cuenten con suficiente solución amortiguadora, se podrá hacer uso de agua destilada o de garrafón para consumo humano. **Nunca con agua del grifo.***

- **Cuidado del material de vidrio y los equipos de medida:** Las probetas graduadas, las pipetas, las cubetas de tinción y los vasos de precipitados deben estar limpios y secos antes de su uso. Si las extensiones de sangre se tiñen con utensilios sucios, se obtendrán resultados deficientes.

El material utilizado para la tinción de Giemsa se debe enjuagar con agua limpia inmediatamente después de usarlo para eliminar la mayor cantidad posible de colorante. Seguidamente debe sumergirse un rato en una solución de detergente antes de lavarlo. Los materiales se pueden lavar con un detergente suave, siempre y cuando se enjuaguen a fondo con agua limpia antes de secarlos. Todo resto de detergente que quede en el material de vidrio o de plástico puede alterar el pH del agua y del colorante, por lo que al volver a utilizar dicho material se obtendrá una tinción deficiente.

Precaución

Durante la tinción con colorante de Giemsa (solución de trabajo de colorante al 3% o al 10%), la superficie se cubre con una película de color verde metálico. Evite que esta se deposite sobre las extensiones de sangre durante el enjuagado, ya que puede obstaculizar el examen microscópico.

Una vez preparadas, las extensiones de sangre deben teñirse lo antes posible. Si las muestras tardan días en ser enviadas al laboratorio para ser teñirlas, la temperatura elevada producirá su autofijación y la gota gruesa puede quedar inutilizada para su observación.

8. Detección microscópica de *Plasmodium* spp. en gota gruesa y frotis de sangre periférica teñidas con Giemsa.

Introducción: El proceso de diagnóstico consiste en la observación microscópica de una muestra de sangre proveniente de un caso probable de paludismo para demostrar la presencia o ausencia de cualquier forma parasitaria de *Plasmodium* spp. en gota gruesa y/o frotis, para lo cual se emplea la técnica de coloración de Giemsa.

Objetivo: Describir el procedimiento mediante el cual se realiza la detección microscópica de *Plasmodium* spp en gota gruesa y frotis de sangre periférica teñidas con Giemsa.

Alcance: Para todos los microscopistas de los laboratorios que realicen el diagnóstico microscópico de paludismo

Materiales:

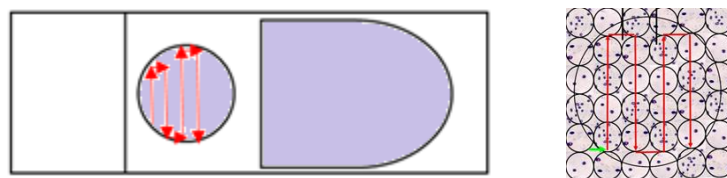
- Microscopio óptico binocular de campo claro con objetivos 10X, 40X y 100X.
- Muestras de gota gruesa y frotis en portaobjetos teñidos con Giemsa
- Aceite de inmersión tipo A en laboratorios con temperatura controlada o tipo B en climas demasiado calurosos sin ventilación o clima controlado, índice de refracción 1.515.
- Papel seda
- Formatos para registro de resultados de observación.

Procedimiento:

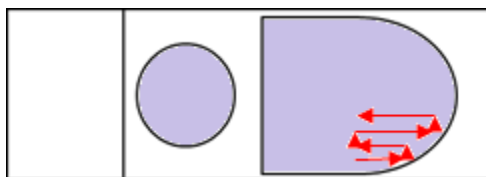
1. Encender el microscopio.
2. Colocar en la platina del microscopio la muestra a analizar con la gota gruesa hacia la izquierda.
3. Ajustar la iluminación y enfocar la muestra con el objetivo 10X.
4. Examinar la muestra, seleccionar una parte de la extensión que esté correctamente teñida y en la que haya leucocitos distribuidos de manera uniforme.
5. Depositar una gotita de aceite de inmersión sobre la gota gruesa.
6. Girar el revólver del microscopio en dirección y hasta la posición del objetivo de 100X sin pasar por el objetivo de 40X.
7. Ajustar el campo con el tornillo micrométrico hasta observar imágenes nítidas y confirmar que la extensión es aceptable para el examen sistemático: tendrá el espesor adecuado si son visibles 15-20 leucocitos por campo de la gota gruesa. *Las extensiones en las que se*

vean menos leucocitos por campo deberán examinarse más detenidamente.

8. Examinar la gota gruesa de manera sistemática. Comenzar por la parte inferior izquierda para luego ir desplazándose verticalmente hacia arriba, campo por campo.
9. Cuando se llegue al otro extremo de la extensión, desplazar el portaobjetos ligeramente hacia la derecha, luego hacia abajo para seguir examinando la extensión campo a campo, y así sucesivamente. Para realizar un examen eficiente, corrija continuamente el enfoque mediante el tornillo micrométrico cuando examine cada campo.



10. Examinar un mínimo de 200 campos microscópicos antes de reportar una muestra negativa (No se observan *Plasmodium* spp). A menor calidad de la muestra, mayor el número de campos que se deben observar, si es posible, se debe examinar toda la muestra.
11. Examinar el frotis para identificar de manera definitiva la especie parasitaria. A diferencia de la gota gruesa, el frotis permite visualizar la morfología de los parásitos y los eritrocitos parasitados.
 - a. Enfocar el frotis en su porción fina con el objetivo 10X.
 - b. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la porción fina del frotis.
 - c. Girar el revólver del microscopio en dirección y hasta la posición del objetivo de 100X sin pasar por el objetivo de 40X.
 - d. Examinar el extremo del frotis, en el cual los eritrocitos están situados unos junto a otros y el solapamiento es mínimo. Siga el recorrido que se muestra en la figura siguiente.



- e. Examinar el frotis hasta confirmar la presencia de parásitos palúdicos e identificar la(s) especie(s). Identificar todas las

especies y las formas evolutivas observadas y anotarlas en los formatos correspondientes.

12. Realizar la estimación de la densidad parasitaria en muestras positivas a paludismo como a continuación se describe:

a. En gota gruesa:

- i. Contar de manera simultánea pero independiente, el número de parásitos asexuados, sexuados y leucocitos campo por campo.
- ii. Una vez contabilizados todos los parásitos y leucocitos, pasar al siguiente campo de acuerdo a recorrido establecido en el punto 9 (tener cuidado de no solapar los campos)
- iii. Dejar de contar bajo los siguientes criterios:
 1. Si ha contado ≥ 100 parásitos en campos que contienen 200 leucocitos.
 2. Si ha contado ≤ 99 parásitos en campos que contienen 500 leucocitos.
 3. Si ha contado 500 parásitos independientemente del número de leucocitos contados.
- iv. Contabilizar todos los parásitos y leucocitos en el último campo, aunque la cifra de leucocitos sea mayor de 200 o 500.
- v. Una vez terminado el recuento, calcular la densidad parasitaria basándose en la cifra real de leucocitos del paciente. Si no dispone de ella, utilice una estimación media de 6000 leucocitos/ μ l de sangre.

$$EAS/\mu l = \frac{No. de EAS contados \times 6,000}{No. de leucocitos contados}$$

$$ESS/\mu l = \frac{No. de ESS contados \times 6,000}{No. de leucocitos contados}$$

- b. **En frotis:** Esta estimación se deberá realizar cuando los parásitos en gota gruesa sean demasiados donde no se tiene la precisión en el conteo, o bien, cuando se reciba una muestra sin gota gruesa pero que el frotis sea adecuado y permita la cuantificación.

- i. Localizar un campo que contenga unos 250 eritrocitos. Cuente el número total de eritrocitos en ese campo y el número de ellos que están parasitados. Un campo típico (con un aumento de 100X) debe contener unos 250 eritrocitos.
- ii. Mediante un contador celular, contar los eritrocitos parasitados y los que no lo estén.
- iii. Una vez contabilizados todos los eritrocitos parasitados y sin parasitar presentes en un campo, desplazar al siguiente según el recorrido que se muestra en el punto 11.
- iv. Repetir el procedimiento de conteo y así sucesivamente. Tenga cuidado de no solapar los campos.
- v. Continuar de manera longitudinal, desplazándose campo a campo por la extensión según el recorrido indicado. En cada campo contabilice todos los eritrocitos parasitados y los que no lo estén, aunque el número total de eritrocitos por campo supere los 250.
- vi. Dejar de contar cuando haya contabilizado unos 20 campos con unos 250 eritrocitos cada uno (en total, 5000 eritrocitos aproximadamente). Anotar en una hoja de cálculo adecuada el número real de eritrocitos parasitados y no parasitados. Utilice estos valores para calcular el número total de parásitos por microlitro de sangre.
- vii. Una vez terminado el recuento, calcular la densidad parasitaria a partir de la cifra real de eritrocitos del paciente. Si no dispone de ella, utilice una cifra media estimada de 5,000,000 de eritrocitos/ μ l y aplique la fórmula que se indica a continuación. Tenga en cuenta que el resultado final se ha redondeado al entero más próximo.

$$\text{EAS}/\mu\text{l} = \frac{\text{No. eritrocitos parasitados con EAS} \times 5,000,000}{\text{No. de eritrocitos contados}}$$

$$\text{ESS}/\mu\text{l} = \frac{\text{No. eritrocitos parasitados con ESS} \times 5,000,000}{\text{No. de leucocitos contados}}$$

9. Uso, cuidado y mantenimiento básico del microscopio

Introducción: Microscopio óptico compuesto de campo claro binocular, oculares antifúngicos 10X, rango de distancia interpupilar de 48-75 mm, objetivos planacromáticos antifúngicos de 10X 40X y 100X (este último de inmersión en aceite con apertura numérica de 1.25), condensador Abbe, NA 1.25/W.D, ajuste Khöler fijo o ajustable, iluminación idealmente LED, Mecanismo de enfoque, recorrido de desplazamiento, tope limitador de ajuste grueso, ajuste de tensión para perilla macrométrica, perilla micrométrica, platina mecánica fija de desplazamiento por cable, voltaje 100-240V.

La calidad de un microscopio está basada principalmente en el sistema óptico, es decir, los lentes que conforman los objetivos, el condensador y oculares con valores altos de apertura numérica que permitan aumentar el poder resolutivo de los microscopios y, por lo tanto, que el equipo pueda facilitar “mayor detalle” en las estructuras parasitarias de *Plasmodium*.

Existe una gran variabilidad de fabricantes de microscopios; sin embargo, no todos utilizan materiales ni procesos de elaboración, no obstante, los productos Zeiss, Olympus, Nikon y Leica reconocidos internacionalmente por su alta calidad.

Objetivo: Describir el protocolo general para el uso, cuidado y mantenimiento de los microscopios en los laboratorios en los que se lleva a cabo el diagnóstico microscópico del paludismo.

Alcance: Para todos los microscopistas de los laboratorios que realicen el diagnóstico microscópico de paludismo

Materiales:

- Microscopio óptico compuesto de campo claro binocular con objetivos 10X 40X y 100X y oculares 10X.
- Funda para protegerlos del polvo
- Papel seda o toallas de algodón suave
- Pañuelos desechables
- Perilla de goma
- Torundas con alcohol al 70%
- Cepillo de cerdas suaves

Procedimiento:

Transporte y desplazamiento

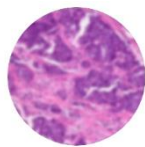
- Transportar los microscopios en la caja original y con el material de embalaje interno para evitar que se muevan dentro de la caja (si no se dispone del embalaje original, utilizar una caja de madera o unicel que contenga espuma o material de relleno para evitar la movilidad del equipo).
- Durante el transporte, proteger el microscopio de las vibraciones y los movimientos excesivos: colocarlo en el interior del vehículo de modo que no se mueva ni pueda caerse de lo alto de otros artículos que esté transportando; resguardarlo del agua (lluvia, inundaciones, inmersión por caída, etc.), el calor excesivo, la luz solar directa y los roedores.
- Al mover el microscopio, tomarlo con las dos manos: sujetar con una la base y con la otra sujetar el brazo.

Colocación

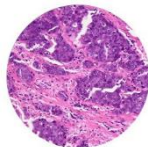
- Instalar el microscopio sobre una mesa de laboratorio lisa, nivelada, firme y libre de vibraciones.
- Colocar el microscopio en una posición en la que quede espacio para que el microscopista ponga cómodamente las piernas debajo de la mesa. Es preferible utilizar sillas ajustables en altura.
- No ubicar el microscopio frente a una ventana por la que entre mucha luz. Situarlo frente a una pared o una ventana cubierta.

Iluminación Köhler

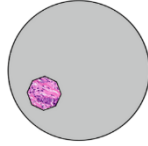
1. Encender el microscopio.
2. Cambiar a un objetivo de baja magnificación en su microscopio, como de 10X.



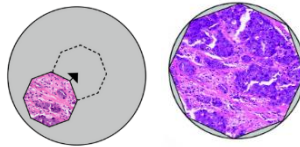
3. Enfocar la muestra como punto de partida para el resto de los ajustes ópticos.



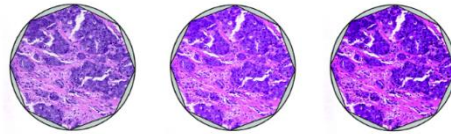
4. Cerrar el tope de campo por completo. De no estar enfocado, ajustar la altura del condensador hasta que las hojas del tope de campo estén lo más nítidas posible, en correspondencia con el enfoque de la muestra.



5. Centrar el tope de campo, usando las dos perillas ubicadas en la parte frontal del condensador. Para verificar la posición central, abra el tope de campo hasta que vea los bordes del octágono alcanzar el borde del campo visual. Ajústelo de ser necesario.



6. Ajustar el diafragma de iris (de apertura) a fin de controlar el contraste y resolución.



7. Ajustar la distancia interpupilar y corrección dióptrica.

Uso del microscopio

1. Conocer los componentes del microscopio y su funcionamiento para utilizarlo de manera eficiente.
2. Encender la fuente de iluminación, regular la intensidad luminosa hasta un punto óptimo.
3. Observar la muestra con el objetivo de 10X, opcionalmente con 40X y por último con el objetivo de 100X cuidando de no ensuciar el objetivo de 40X con aceite de inmersión.
 - o Si el objetivo de 40X entra en contacto con el aceite de inmersión, limpiarlo inmediatamente con una torunda alcoholada al 70%.
 - o Una vez terminado el examen microscópico con el objetivo de 100X, eliminar de inmediato los restos de aceite con papel para limpieza de lentes, una toallita absorbente suave o una torunda seca (solo por contacto) y posteriormente con una torunda alcoholada al 70% o solución para limpieza comercial o casera (si no se realiza este procedimiento, con el tiempo el aceite se espesará y solidificará, y el rendimiento óptico de la lente se verá afectado).

Limpieza del microscopio

El objetivo es remover completamente el polvo y la suciedad sin dejar residuo alguno de las sustancias de limpieza y sin dañar las superficies.

Materiales:

- Palillos de madera largos y delgados.
- Algodón extra puro.
- Los hisopos de poliéster absorbente para limpieza de componentes ópticos, son una excelente alternativa.
- Agua destilada.
- Solución de líquido lavavajillas recién preparada a proporción de 5-10 gotas de líquido por 10 ml de agua destilada.

Para la fácil limpieza de las lentes frontales de los objetivos de inmersión), utilice pañuelos desechables mojados en la solución de líquido lavavajillas.

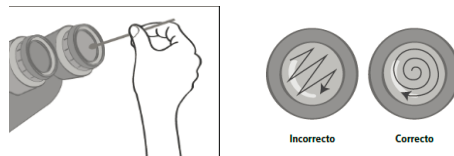
Para la limpieza del resto de las superficies ópticas, utilice cualquier hisopo de algodón recién hecho.

Procedimiento:

1. Elimine todas las partículas de polvo con el soplador.
2. Remueva toda la suciedad soluble con agua destilada.
3. Si no lo consigue, repita usando la solución a base de líquido lavavajillas.
4. Para remover residuos grasos, utilice primero la solución a base de líquido lavavajillas.
5. Coloque los objetivos y oculares sobre una superficie libre de polvo (ejemplo: papel aluminio nuevo).
6. Sumerja el hisopo de algodón en solución preparada para limpieza y sacuda el exceso de líquido.



7. Para limpiar, mueva el hisopo en espiral desde el centro del lente hasta su borde (nunca limpie usando movimientos en zigzag ya que esto solo esparcirá la suciedad).



8. Por lo general se recomienda repetir la limpieza varias veces.

Recomendaciones

- Inspeccionar el microscopio para verificar que no presenta daños ni fallos de funcionamiento.
- Limpiar los componentes mecánicos con un paño limpio
- Limpiar el objetivo de inmersión después de usarlo.
- Nunca dejar microscopios sin objetivos.
- Nunca limpiar objetivos ni oculares con xilol (disuelve el cemento que sostiene los lentes).
- No tocar los lentes frontales con los dedos.
- No cargar el microscopio del brazo con una sola mano.
- No intercambiar objetivos entre diferentes marcas o modelos de microscopios.
- Bajar la platina antes de colocar una lámina.
- Enfocar a 10X antes de mover a 100X.
- Cubrir el microscopio cuando se utilice.
- Apagar y desenchufar el microscopio al final del día.
- Guardar el microscopio en un lugar seco y fresco para evitar el crecimiento de hongos sobre las lentes.
- No intercambie los elementos ópticos y los huecos de adaptación de estos con los de otros microscopios.
- Mantenimientos preventivos y correctivos, deben ser realizados por un experto técnico calificado.
- Anotar todas las observaciones en la bitácora de uso de microscopio.

Anexo III: Especificaciones generales del laboratorio

Infraestructura

- Área independiente, ventilada con un área mínima de 2m² por analista de acuerdo a la NOM-007-SSA3-2011, bien iluminada, ventilada, con acceso a fuentes de energía, tarja de tinción con acceso a agua corriente y drenaje, desecho de residuos y condiciones ambientales libre de ruido
- En lugares calurosos y húmedos donde no haya aire acondicionado, se sugiere el uso de ventilador eléctrico, de preferencia de techo, así como proteger las ventanas para evitar la entrada de insectos.
- Se deben proporcionar espacio y condiciones de almacenamiento que aseguren la integridad permanente de las muestras, los materiales, documentos, equipos, reactivos, registros, resultados y de cualquier otro artículo que pudiera afectar a la calidad de los resultados de los análisis.

Equipo

- Microscopio óptico compuesto de campo claro binocular, oculares antifúngicos 10X, objetivos Planacromáticos antifúngicos de 10X 40X y 100X (este último de inmersión en aceite con apertura numérica de 1.25), condensador Abbe, NA 1.25/W.D, ajuste khöler fijo o ajustable, iluminación idealmente LED, Mecanismo de enfoque, recorrido de desplazamiento, tope limitador de ajuste grueso, ajuste de tensión para perilla macrométrica, perilla micrométrica, platina mecánica fija de desplazamiento por cable, voltaje 100-240V (las casas fabricantes Olympus, Carl Zeiss, Nikon o Leica son reconocidas debido su alta calidad y eficiencia).
- Filtro azul claro no esmerilado (en caso de usar un microscopio con lámpara de halógeno)
- Lámpara 6 V 30 W

Nota: En climas cálidos en donde el laboratorio no tenga aire acondicionado el microscopio se debe guardar siempre cubierto para evitar el polvo y en lugares sin humedad para evitar la formación de hongos sobre los lentes.

Materiales

Para toma de la muestra

- Lancetas estériles
- Portaobjetos con un espesor de 0.8-1.1 mm y con una medida de 25 x 75 mm idealmente liso; sin embargo, se puede utilizar con un lado esmerilado, siempre y cuando se capacite correctamente sobre su uso.
- Algodón de fibra larga o gasas
- Alcohol etílico al 70% comercial
- Lápiz de grafito
- Papel filtro Whatman (en caso que se requiera)

Para la tinción

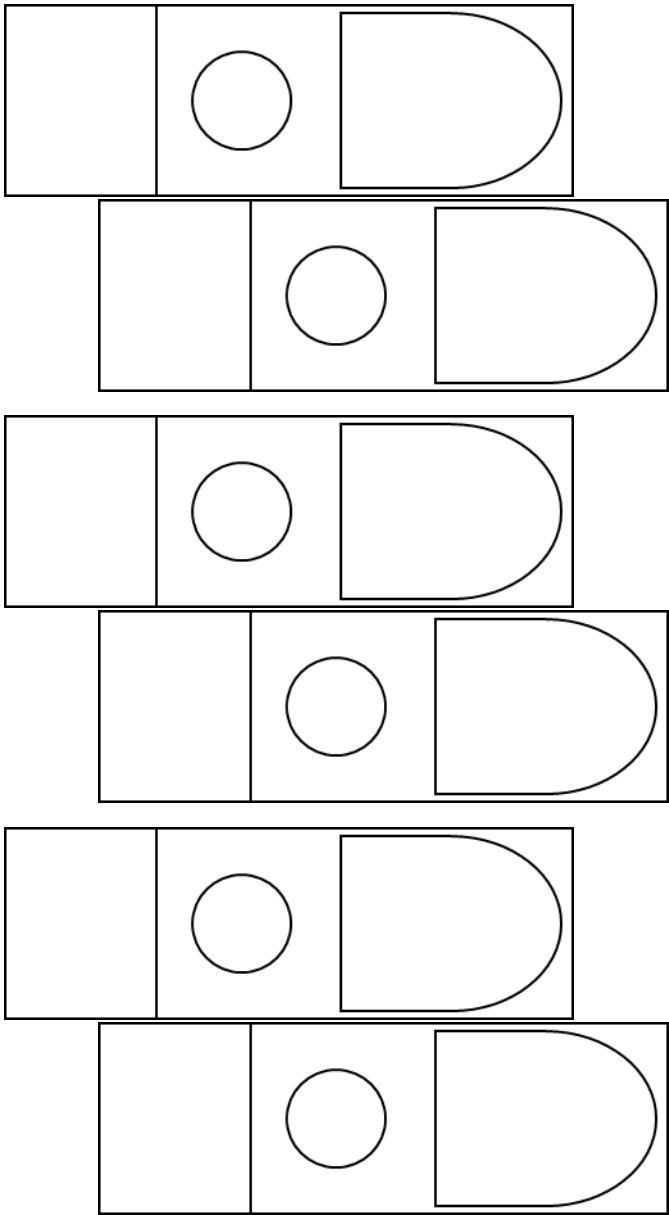
- Colorante Giemsa de buena calidad (se sugieren las marcas SIGMA, MERCK o HYCEL por su alta calidad).
- Alcohol metílico absoluto q. p.
- Solución madre Giemsa
- Solución amortiguadora PBS pH 7.2
- Cronómetro
- Gradillas

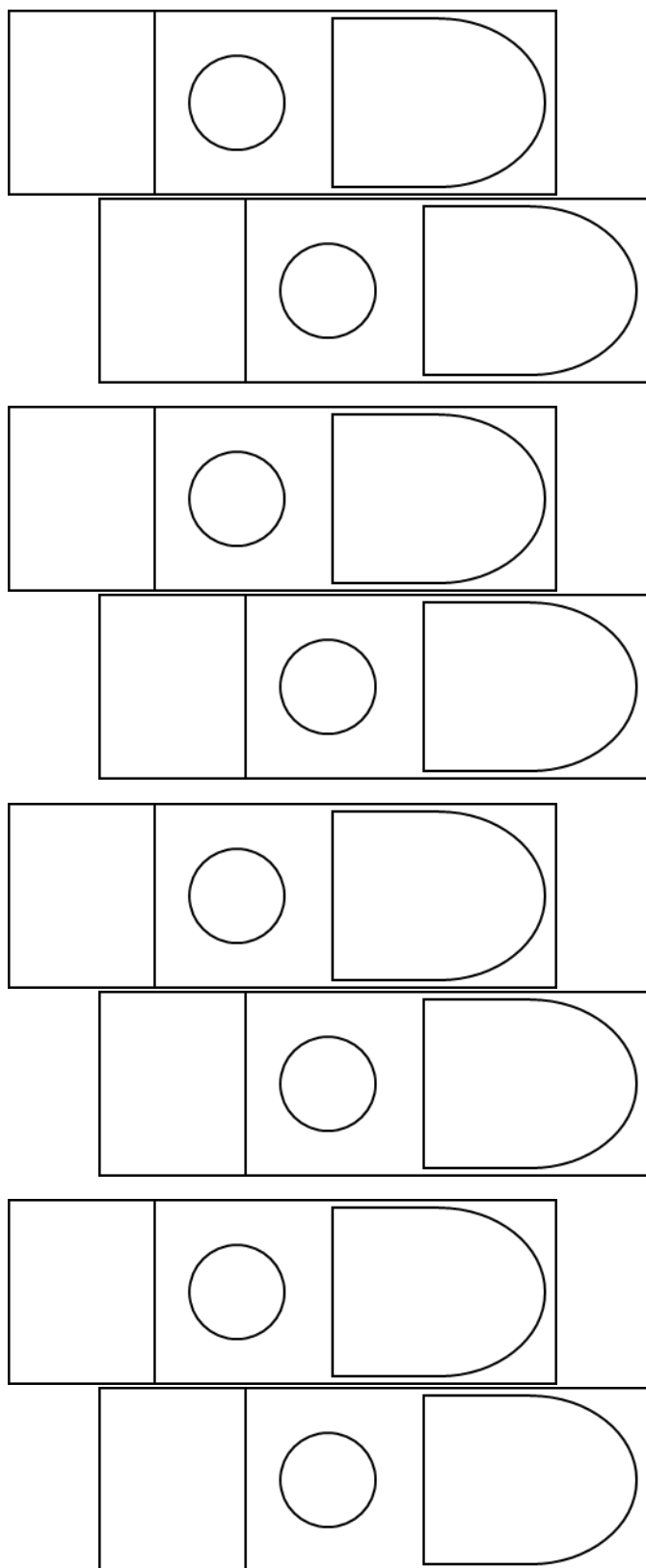
Para lectura, almacén temporal y envío de laminillas

- Aceite de inmersión tipo A en laboratorios con temperatura controlada o tipo B en climas demasiado calurosos sin ventilación o clima controlado, índice de refracción 1.515.
- Caja seleccionadora de muestras
- Caja seleccionadora de alto impacto para portaobjetos
- Cartón acanalado, cordel y papel de estraza para envolver
- Formatos de registro necesarios
- Papel seda
- El contador diferencial de células

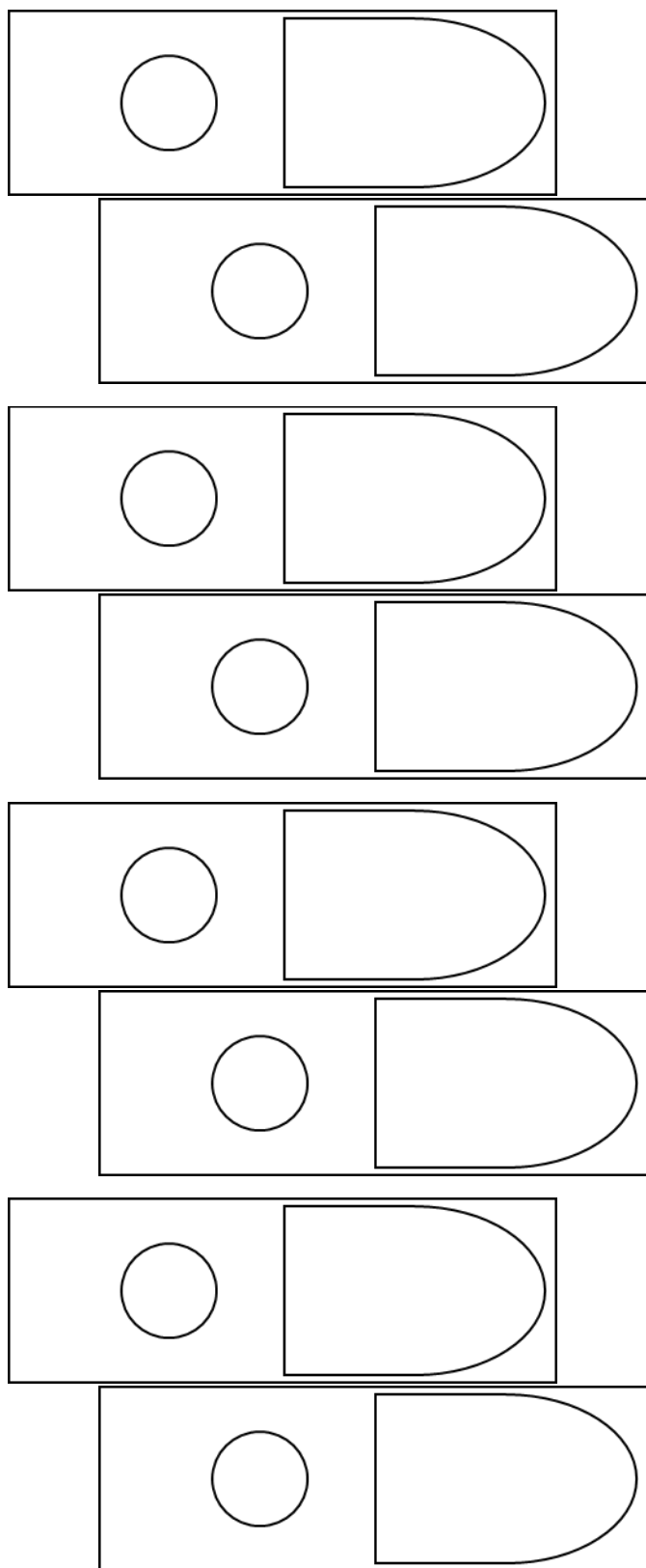
Anexo IV: Plantillas y formatos

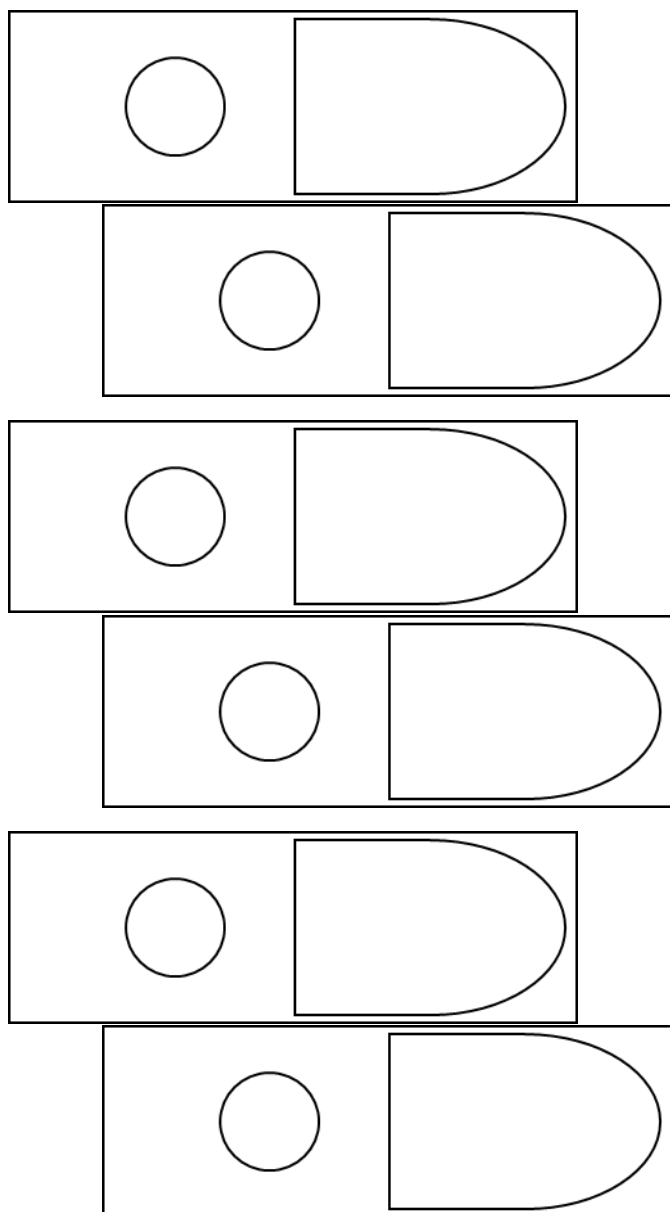
Plantilla para elaboración de gota gruesa y frotis en portaobjetos con un lado esmerilado.





Plantilla para elaboración de gota gruesa y frotis en portaobjetos liso.







Dr. Manuel Martínez Báez*

LABORATORIO DE PALUDISMO

Registro nominal de muestras leídas para el diagnóstico microscópico de paludismo

CLAVE
PALUPA

Página 1 de 3

[illegible]

Nombre firma de supervisión LESP

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez" LABORATORIO DE PALUDISMO Informe diario, semanal y mensual de la observación microscópica M-1	CLAVE: PALU-PA-02
		Página 1 de 2

ESTADO	NOMBRE Y Nº DE JURISDICCIÓN SANITARIA/UNIDAD MÉDICA	MUNICIPIO
MES	AÑO	NOMBRE Y CLAVE DEL MICROSCOPISTA

Nº Semana Epi. ¹	Dia	Fecha ²	Muestras hemáticas en gota gruesa y extendido fino										POR OBSERVAR ⁵		
			Recibidas ³	MUESTRAS OBSERVADAS ⁴								Total		Pendientes	Excedentes
				Personal de Programa		Notificantes		Microscopista							
				Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	Negativas	Positivas				
	Domingo														
	Lunes														
	Martes														
	Miércoles														
	Jueves														
	Viernes														
	Sábado														
	Subtotal ⁶														
	Observaciones:														
	Domingo														
	Lunes														
	Martes														
	Miércoles														
	Jueves														
	Viernes														
	Sábado														
	Subtotal ⁶														
	Observaciones:														
	Domingo														
	Lunes														
	Martes														
	Miércoles														
	Jueves														
	Viernes														
	Sábado														
	Subtotal ⁶														
	Observaciones:														
	Domingo														
	Lunes														
	Martes														
	Miércoles														
	Jueves														
	Viernes														
	Sábado														
	Subtotal ⁶														
	Observaciones:														
TOTAL DE MES ⁷															
OBSERVACIONES DEL MES ⁸															

Fecha de remisión	Nombre y firma del microscopista	Nombre y firma de supervisión vectores/LESP
-------------------	----------------------------------	---

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez" LABORATORIO DE PALUDISMO Informe diario, semanal y mensual de la observación microscópica M-1	CLAVE: PALU-PA-02
		Página 2 de 2

Instructivo de llenado:

Colocar datos correspondientes al estado, nombre, número de jurisdicción o distrito sanitario, municipio, mes, año así como nombre, clave del microscopista y llenar el cuadro de muestras hechas como a continuación se describe:

1. Colocar el número de la semana epidemiológica correspondiente.
2. Colocar la fecha correspondiente al día de la semana laborado.
3. Anotar el número total de laminillas recibidas en el día referido en el punto anterior (en caso de no recibir muestras se colocará el número 0).
4. Al finalizar la lectura de todas las laminillas recibidas, anotar el número de laminillas positivas y negativas resultantes que fueron tomadas por el personal de programa, atención médica, notificantes voluntarios así como las tomadas por el microscopista (cuando aplique), así como el total de laminillas resultado de la
5. Colocar el número de muestras pendientes (cuando por alguna situación no se cumplió con la demanda de muestras tomadas sabiendo que la lectura máxima recomendada es de 50 laminillas diarias) y el número de muestras excedentes (cuando se recibieron más de 50 laminillas, no se alcanzan a leer en ese día, pero deben de leer al día siguiente).
6. Colocar el número total de laminillas hechas durante la semana epidemiológica, sumando los valores diarios de cada variable.
7. Colocar el número total de laminillas hechas durante el mes, sumando los valores subtotales de cada variable.

Cualquier información relevante y referente a la observación microscópica, anotarlo en el apartado de observaciones.

NOTA 1: El formato deberá ser llenado con tinta azul, la información de los cuadros serán llenados con tinta azul, cuando la información corresponda a muestras negativas y con tinta roja cuando corresponda a muestras positivas.

NOTA 2. No se deberán dejar espacios vacíos, cuando no se tenga información para completar algún campo del formato, este deberá ser cancelado.

NOTA 3. Cuando se complete la información mensual de muestras hechas, este registro debe ser archivado en un folder o carpeta, para completar una bitácora anual y deberá ser resguardada en el laboratorio de microscopía y deberá estar disponible en todo momento con fines de supervisión.



ESTADO	NOMBRE Y N° DE JURISDICCIÓN SANITARIA/UNIDAD MÉDICA	MUNICIPIO	MES	AÑO
--------	---	-----------	-----	-----

[illegible]

[illegible]

Nombre y firma de supervisión

	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez" LABORATORIO DE PALUDISMO	CLAVE: PALU-PA-03
Relación de localidades con información M-2		Página 3 de 3

Instructivo de llenado (anverso del formato):

1. Colocar el número consecutivo.
2. Anotar el nombre de la localidad
3. Colocar la clave INEGI de la localidad
4. Anotar el número de la semana epidemiológica y en los cuadros subsecuentes colocar el número de laminillas positivas y negativas leídas por tipo de notificación así como el total de muestras positivas y negativas por cada semana epidemiológica
5. Colocar el número de laminillas positivas y negativas totales mensuales por localidad
6. Colocar la sumatoria de laminillas positivas y negativas del total de localidades de acuerdo a fuente de notificación.

NOTA 1: El formato deberá ser llenado con tinta azul, la información de los cuadros serán llenados con tinta azul, cuando la información corresponda a muestras negativas y con tinta roja cuando corresponda a muestras positivas.

NOTA 2: No se deberán dejar espacios vacíos, cuando no se tenga información para completar algún campo del formato, este deberá ser cancelado.

8. RESULTADO DEL CONTROL DE CALIDAD INDIRECTO REALIZADO POR EL LESP (continuación)

[illegible]

Firma del microscopista municipal/jurisdiccional

Fecha de envío

Firma del microscopista LESP

Fecha de observación

Nombre firma de supervisión LESP

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez" LABORATORIO DE PALUDISMO	CLAVE: PALU-PA-04
	Envío semanal de láminas de gota gruesa para control de calidad indirecto por microscopía M3	Página 3 de 3

Instructivo de llenado :

1. Resumen semanal (requisitado por el nivel local): Colocar la información referente al número de localidades con información, localidades con muestras positivas, número de muestras observadas en la semana, número de microscopistas por día, número de muestras por microscopía por día así como el número de muestras excedentes de la semana epidemiológica correspondiente.

2. Muestras enviadas al LESP (requisitado por el nivel local): Colocar la información desglosada del número de muestras positivas y negativas de búsqueda/seguimiento enviadas por el nivel local al Laboratorio Estatal de Salud Pública para su control de calidad.

3. Muestras enviadas al InDRE (requisitado por el LESP): Colocar la información desglosada del número de muestras positivas y negativas de búsqueda/seguimiento enviadas por el estatal al InDRE para su control de calidad.

4. Colocar la terminación de muestras negativas enviadas al LESP (requisitado por el nivel local)

5. En caso de encontrar discordancias, se debe enviar al LESP el 90% de muestras negativas faltantes, por lo que el nivel local debe requisitar un nuevo formato y enviarlo con la información faltante.

6. Muestras hemáticas positivas (requisitado por el nivel local): Colocar la clave de la laminilla positiva registrada, Colocar una "X" en la casilla correspondiente a la especie de *Plasmodium* confirmada, Colocar una "X" en las formas parasitarias observadas EAS o ESS así como la densidad parasitaria por microlitro de sangre (una vez realizada la ecuación).

7. Información de localidades con muestras de sangre positivas: (requisitado por el nivel local): Anotar la información referente a la localidad, municipio, número de muestras positivas de esa localidad y anotar el número de muestras correspondiente a las especies detectadas.

8. Resultado del control de calidad indirecto realizado por el LESP (requisitado por el nivel estatal): Colocar la información referente a cada lámina positiva y negativa enviada al InDRE para control de calidad.

NOTA 1: El formato deberá ser llenado con tinta azul, la información de los cuadros serán llenados con tinta azul, cuando la información corresponda a muestras negativas y con tinta roja cuando corresponda a muestras positivas.

NOTA 2. No se deberán dejar espacios vacíos, cuando no se tenga información para completar algún campo del formato, este deberá ser cancelado.

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez" LABORATORIO DE PALUDISMO		CLAVE: PALU-PA-05
	Bitácora de uso de microscopio		Página 2 de 2

Instructivo de llenado (anverso del formato):

1. Colocar el número consecutivo.
2. Anotar fecha (dd-mm-aaa)
3. Anotar la hora de encendido del equipo (hh:mm)
4. Anotar en horas (h) el tiempo de uso del microscopio.
5. Colocar un "X" o "✓" según corresponda el proceso de limpieza básica del microscopio (limpieza de sistema mecánico y/o óptico con etanol 70%).
6. Colocar un "X" o "✓" según corresponda si se realizó o no el ajuste de köhler.
7. Colocar un "X" o "✓" según corresponda al funcionamiento del microscopio en sus tres componentes básicos.
8. Describir de manera concisa la falla encontrada de acuerdo al punto 7, o bien, colocar cualquier observación relevante sobre el equipo.
6. Firma del microscopista

NOTA 1: El formato deberá ser llenado con tinta azul

NOTA 2. No se deberán dejar espacios vacíos, cuando no se tenga información para completar algún campo del formato, este deberá ser cancelado.

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez"		clave/revisión PALU-F-21/3
	Laboratorio de Paludismo		emisión: 1-febrero-2024
	Registro de Resultados del Panel de Evaluación del Desempeño para Microscopistas de Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Vector (PEDMiVec)-Paludismo		

Nombre, Clave y Firma del microscopista evaluado: _____ No. de panel: _____ Fecha de evaluación: _____

Jurisdicción y municipio: _____

Nombre y Firma del responsable de la aplicación de la evaluación: _____

No. de Laminilla	Código de laminilla ¹	Detección ²		Identificación de especie ³		Formas parasitarias ⁴		Densidad Parasitaria ⁵	
		Pos.	Neg.	P. vivax	P. falciparum	EAS	ESS	Parásitos contados EAS+ESS	Leucocitos contados
1									Parásitos totales/microlitro.
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									
11									

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez"	clave/revisión PALU-F-21/3
	Laboratorio de Paludismo	emisión: 1-febrero-2024
Registro de Resultados del Panel de Evaluación del Desempeño para Microscopistas de Enfermedades Parasitarias Transmitidas por Vector (PEMivVec)-Paludismo		

Instructivo de llenado

1. Anotar el código de la laminilla que se encuentra en la etiqueta y que comienza con la abreviación PALU.
2. Colocar una "X" o "✓" en la casilla **Pos** si el resultado de su observación es positivo o en la casilla **Neg** si el resultado de su observación es negativo.
3. Colocar una "X" o "✓" en la casilla **P. vivax** si identifica la muestra positiva como *Plasmodium vivax* o en **P. falciparum** si identifica la muestra positiva como *Plasmodium falciparum*.
4. Colocar una "X" o "✓" en las casillas **EAS** o **ESS** según corresponda la observación de estadios asexuados sanguíneos (trofozoítos y/o esquizontes) o estadios sexuados sanguíneos (gametocitos).
5. Anotar el valor de densidad parasitaria de todas las muestras positivas e identificadas en especie de acuerdo a los siguientes criterios:
 - a. Con el objetivo de 10X seleccionar una zona homogénea del lado izquierdo de la gota gruesa y cambiar su objetivo a 100X.
 - b. Realizar una búsqueda sistemática, campo por campo, hasta encontrar el primer parásito.
 - c. Al momento de encontrar el primer parásito, iniciar la cuenta de manera simultánea e independiente de parásitos (EAS+ESS) y leucocitos recorriendo los campos hacia arriba o hacia abajo hasta el borde de la muestra, si termina la línea de lectura y no ha completado el número de leucocitos que debe cuantificar, desplazar un campo lateral hacia la derecha y continuar desplazando hacia abajo o hacia arriba (según corresponda) hasta terminar el análisis de la muestra conforme a lo siguiente:
 - Si al contar 200 glóbulos blancos, 100 o más parásitos son observados, aplique la fórmula con base a los 200 leucocitos.
 - Si al contar 200 glóbulos blancos, 99 o menos parásitos son observados, continúe el recuento hasta llegar a los 500 leucocitos y aplique la fórmula con base a los 500 leucocitos.
 - Si se cuentan 500 o más parásitos sin llegar a contar los 200 leucocitos, el recuento se dará por terminado al finalizar la lectura del último campo y la parasitemia debe calcularse según la fórmula correspondiente.
6. Al concluir el análisis, aplicar la fórmula para densidad parasitaria por µL de sangre.

$$\text{Parásitos totales/microlitro} = \frac{\text{parásitos totales contados} \times 6000}{\text{número de leucocitos contados}}$$

NOTAS: El registro deberá ser llenado a tinta negra o azul.
Cancelar espacios en blanco.
El valor de la densidad parasitaria debe estar representado en números enteros.

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez"	clave/revisión PALU-F-22/3
	Laboratorio de Paludismo	emisión: 1-febrero-2023
Formato de Apoyo para Realizar Densidad Parasitaria		

Nombre y clave del microscopista evaluado: _____

No. de panel: _____. No. de laminilla _____. Código de laminilla _____

No. de Campo ¹	No. de Leucocitos ²	No de parásitos (EAS+ESS) ³	No. de Campo ¹	No. de Leucocitos ²	No de parásitos (EAS+ESS) ³	No. de Campo ¹	No. de Leucocitos ²	No de parásitos (EAS+ESS) ³
1			21			41		
2			22			42		
3			23			43		
4			24			44		
5			25			45		
6			26			46		
7			27			47		
8			28			48		
9			29			49		
10			30			50		
11			31			51		
12			32			52		
13			33			53		
14			34			54		
15			35			55		
16			36			56		
17			37			57		
18			38			58		
19			39			59		
20			40			60		

Sumatoria de leucocitos⁴ _____ parásitos totales⁵ _____

$$\text{Parásitos totales/microlitro} = \frac{\text{parásitos totales contados} \times 6000}{\text{número de leucocitos contados}}$$

Densidad parasitaria⁶ _____ (parásitos/microlitro)

 SECRETARÍA DE SALUD	INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS "Dr. Manuel Martínez Báez"	clave/revisión PALU-F-22/3
		emisión: 1-febrero-2023
	Laboratorio de Paludismo Formato de Apoyo para Realizar Densidad Parasitaria	

Instructivo de llenado

Este formato es de apoyo para llevar a cabo la densidad parasitaria; Si realiza la cuenta con el contador de células lo puede omitir y no es necesario enviarlo al InDRE.

1. Establece el número de campo microscópico.
2. Anotar el número de leucocitos que observe en el campo microscópico.
3. Anotar el valor de la suma de EAS y ESS que observe en el campo microscópico. Ejemplo: si observas 5 estadios asexuados y 3 estadios sexuados, colocar el resultado de la suma que es 8. Continuar con el número de campos necesarios hasta completar 200 leucocitos, 500 leucocitos o 500 parásitos según corresponda.
4. Anotar el resultado de la sumatoria de leucocitos contados en todos los campos microscópicos.
5. Colocar el resultado de la sumatoria de parásitos totales (EAS+ESS) contados en todos los campos microscópicos.
6. Colocar el valor de la densidad parasitaria por microlitro de sangre de acuerdo a la siguiente fórmula:

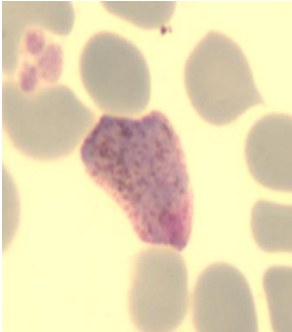
$$\text{Parásitos totales/microlitro} = \frac{\text{parásitos totales contados} \times 6000}{\text{número de leucocitos contados}}$$

NOTAS: El registro deberá ser llenado a tinta negra o azul.

Cancelar espacios en blanco.

El valor de la densidad parasitaria debe estar representado en números enteros.

Anexo V: Imágenes de portada

Imagen	Fuente
 Imagen All.4	Tofozoíto de <i>Plasmodium vivax</i> , imagen magnificada a 1000 aumentos. Laboratorio de Paludismo, InDRE

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología

Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez"