

# **UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS**

**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA**



## **TESIS**

**“VALIDACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO MÉTODO  
DIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIA sp. EN BIOPSIAS CUTÁNEAS Y  
MUCOCUTÁNEAS EN EL HOSPITAL REGIONAL CUSCO – ENERO A  
JUNIO DEL 2018”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO POR**  

---

**BACH. FUENTES BORDA, JHAROL CRISTIAN**  

---

Para optar al Título Profesional de Licenciado en  
Tecnología Médica.

**ESPECIALIDAD**

---

**LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**  

---

**ASESOR**

---

**LIC. TM. BECERRA MARTÍNEZ, CAMILO**  

---

Cusco, Perú

2019

## **DEDICATORIA**

*A Dios.*

*Por haberme permitido llegar hasta este punto y hacerme entender que la vida está plagada de retos y uno de ellos son los estudios, que concierne para mi vida y mi futuro.*

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, agradecer a mis padres Félix Fuentes, Elvira Borda, Julia Fuentes y mis hermanos: Yoana, Irving, Chrisber, Jackeline, Juan, Emma, Joseph y Dante: quienes fueron mi motivo de superación por todas las adversidades que pasamos y por compartir una infancia feliz. Así mismo agradecer a mis expertos; Dra. Luna: por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, Dra. Aragón: por sus ideas y su experticia, Dra. Mabel Aucca: por su orientación y experticia; y mis compañeros: Lic. TM. Abelardo Álvarez, Lic. TM. Ricardo Santos, Tec. Lab. Edward Santander; que son parte de estas metas logradas.

También agradecer a mi asesor de trabajo Lic. TM. Camilo Becerra Martínez; por disponer su tiempo y atención a mis consultas.

Gracias a mis amigos, por su gran apoyo moral e incondicional que fueron necesarios en momentos difíciles para realizar el presente trabajo de investigación y así conseguir esta anhelada profesión.

Finalmente, muchas gracias a todos.

## **PRESENTACIÓN**

SEÑOR DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MEDICA DE LA UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS FILIAL CUSCO, DISTINGUIDOS MIEMBROS REVISORES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS.

En cumplimiento con las disposiciones legales y normas vigentes de la Universidad y la Escuela Académico Profesional de Tecnología Médica a nivel de pregrado y posgrado, referente a la obtención del título profesional de Licenciado en Tecnología Médica, especialidad en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica, pongo a vuestra consideración el presente trabajo de investigación que lleva como título:

**“VALIDACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUIMICA COMO MÉTODO DIAGNOSTICO PARA LEISHMANIA sp EN BIOPSIAS CUTÁNEAS Y MUCOCUTÁNEAS EN EL HOSPITAL REGIONAL CUSCO-ENERO A JUNIO DEL 2018”.**

Durante el internado realizado el 2017, se observó que en el Hospital Regional del Cusco, se viene empleando el método inmunohistoquímico en otras patologías tumorales y no tumorales y con la presente investigación, pretendo dar a conocer la importancia de la inmunohistoquímica; utilizando suero humano hiperinmune como anticuerpo primario para el diagnóstico de Leishmania sp comparado con el método convencional hematoxilina-eosina.

El mismo que ha sido desarrollado, cumpliendo con los requisitos exigidos ya la metodología planteada para desarrollar dicho trabajo de investigación.

**El autor.**

## INTRODUCCIÓN

El siguiente trabajo de investigación denominado “Validación de la inmunohistoquímica como método diagnóstico para *Leishmania* sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas”, manifiesta la gran importancia por su sensibilidad y su alta concordancia diagnóstica a la hora de su identificación parasitaria.

Es por ello que se ha propuesto cubrir la presente investigación con la siguiente interrogante: ¿Cómo validar la aplicación de la inmunohistoquímica como método diagnóstico para *Leishmania* sp en relación a la tinción convencional hematoxilina-eosina en biopsias cutáneas y mucocutáneas?. Planteando como objetivo principal, “Validar la Inmunohistoquímica como método diagnóstico para *Leishmania* sp en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina en biopsias cutáneas y mucocutáneas”. Sugiriendo como hipótesis de investigación que: La inmunohistoquímica tiene validez diagnóstica para *Leishmania* sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas.

Dentro de la estructura del trabajo de investigación se tiene como primer capítulo el planteamiento y justificación de la investigación, que presenta la problemática planteada, refiriéndose al método inmunohistoquímico como método diagnóstico para *Leishmania* sp, haciendo énfasis en la importancia (dando razones al que, porque y para que) del estudio. A partir de lo cual, se propone el problema general y específicos seguido del objetivo general y específico.

El segundo capítulo, muestra el diseño del marco teórico y bases legales. Se revisan las principales definiciones del parásito de la *Leishmania*, definiciones sobre los métodos diagnósticos como la inmunohistoquímica y la hematoxilina-eosina. Y también definiciones de términos empleados en la presente investigación.

El tercer capítulo, describe la hipótesis planteada, la identificación de las variables y su respectiva operacionalización de cada una de las variables.

El cuarto capítulo, se describen las características de la investigación, como, el diseño metodológico, tipo de investigación, el proceso de investigación, el método científico, los instrumentos de investigación, la población de referencia y la muestra de estudio.

En el quinto capítulo, nos presenta los resultados obtenidos en la identificación parasitaria de la *Leishmania* sp por ambos métodos diagnósticos. En base a ello se llegan a las conclusiones más importantes planteado en nuestro problema general y específico de la presente investigación, el análisis de la interpretación de los resultados, a partir de lo cual se realizan sugerencias como un intento de dar respuesta a la problemática del estudio planteado.

## RESUMEN

La leishmaniasis en el Perú es conocida con el término quechua de “uta”, y se constituye como la segunda endemia tropical. En los últimos años se fue convirtiendo un problema de salud pública e indica; según el sexo: los pacientes masculinos representan el 96.2%, pacientes de sexo femenino el 3.8%, por la procedencia de lugar de probable contagio: la Región Cusco representa el 47.2 % y de igual forma la Región de Madre de Dios con un 47.2 %. Y por el tipo de lesión que estos manifiestan: las lesiones cutáneas predominan con un 67.9% seguida de las lesiones mucocutáneas con 37.1%), haciendo un total de 53 casos (100%) que fueron atendidos por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Regional Cusco de enero a junio del 2018. El objetivo del presente trabajo fue validar la inmunohistoquímica como método diagnóstico para *Leishmania* sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas.

Metodología: se seccionaron 53 bloques parafinados de biopsias cutáneas y mucocutáneas para la inmunohistoquímica, utilizando suero humano hiperinmune como anticuerpo primario diluido en 1/40, infectado naturalmente con *Leishmania* sp., seguido de anti-anticuerpos basado en el sistema de detección: tecnología de polímero compacto. Dicho método se comparó con la tinción convencional hematoxilina-eosina; y para las lecturas de las láminas de ambos métodos, se derivó a dos expertos médicos anatómicos patólogos.

Resultados: bajo el método inmunohistoquímico se obtuvo una sensibilidad de 92%, especificidad de 96.4 % y de acuerdo al índice de Kappa el nivel de concordancia interobservador fue de 0.773, obteniendo ambos expertos una “Concordancia Buena”.

Conclusión: el método inmunohistoquímico mostro sensibilidad de 92%, especificidad 96.4 % y nivel de concordancia interobservador de acuerdo al índice Kappa de 0.773 (concordancia buena).

**Palabras clave: inmunohistoquímica, leishmaniasis, sensibilidad, especificidad.**

## ABSTRACT

Leishmaniasis in Peru is known by the Quechua term "uta", and is the second tropical endemic. In recent years it has become a public health problem and indicates; according to sex: male patients represent 96.2%, female patients 3.8%, for the provenance of place of probable contagion: the Cusco Region represents 47.2% and likewise the Madre de Dios Region with 47.2% . And for the type of injury they manifest: skin lesions predominate with 67.9% followed by mucocutaneous lesions with 37.1%), making a total of 53 cases (100%) that were attended by the Pathological Anatomy Service of the Regional Hospital Cusco from January to June 2018. The objective of this study was to validate immunohistochemistry as a diagnostic method for *Leishmania* sp in skin and mucocutaneous biopsies.

Methodology: 53 paraffin blocks of cutaneous and mucocutaneous biopsies were sectioned for immunohistochemistry, using hyperimmune human serum as primary antibody diluted in 1/40, naturally infected with *Leishmania* sp., Followed by anti-antibodies based on the detection system: compact polymer. Said method was compared with conventional hematoxylin-eosin staining; and for the readings of the sheets of both methods, it was derived to two anatomical pathologists medical experts. Results: under the immunohistochemical method a sensitivity of 92% was obtained, specificity of 96.4% and according to the Kappa index the level of interobserver concordance was 0.773, obtaining both experts a "Good Concordance".

Conclusion: the immunohistochemical method showed sensitivity of 92%, specificity 96.4% and level of interobserver concordance according to the Kappa index of 0.773 (good agreement).

**Key words: immunohistochemistry, leishmaniasis, sensitivity, specificity**

# ÍNDICE

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
PRESENTACIÓN.....	iv
INTRODUCCIÓN .....	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPITULO I.....	1
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA .....	1
1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	2
1.2.1 PROBLEMA GENERAL .....	2
1.2.2 PROBLEMAS ESPECÍFICOS .....	2
1.3 FORMULACIÓN DE OBJETIVOS .....	3
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.4.1 JUSTIFICACIÓN TEÓRICA.....	4
1.4.2 JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA .....	4
1.4.3 JUSTIFICACIÓN SOCIAL .....	4
1.5 DELIMITACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN .....	5
1.5.1 DELIMITACIÓN GEOGRÁFICA .....	5

1.5.2	DELIMITACIÓN TEMPORAL .....	5
1.6	LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
1.7	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	5
CAPITULO II.....		6
2	MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL .....	6
2.1	ANTECEDENTES INTERNACIONALES .....	6
2.2	BASES LEGALES .....	10
2.3	BASES TEÓRICAS .....	10
2.3.1	LEISHMANIA.....	10
2.3.2	MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO .....	13
2.3.3	MÉTODO TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA .....	17
2.3.4	CONTROL DE CALIDAD - PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE ERRORES .....	19
2.3.5	SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS.....	19
2.3.6	NIVEL DE CONCORDANCIA INTEROBSERVADOR-ÍNDICE KAPPA.....	20
2.3.7	DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS .....	21
CAPITULO III.....		22
3	HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN .....	22
3.1	HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN .....	22
3.1.1	HIPÓTESIS GENERAL .....	22
3.2	VARIABLES .....	22
3.2.1	VARIABLE INDEPENDIENTE 1.....	22

3.2.2	VARIABLE INDEPENDIENTE 2.....	22
3.2.3	VARIABLE DEPENDIENTE.....	22
3.2.4	VARIABLES INTERVINIENTES.....	22
3.2.5	OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE.....	23
CAPITULO IV.....		25
4	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
4.1	TIPO NIVEL Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	25
4.1.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	25
4.1.2	NIVEL DE INVESTIGACIÓN.....	25
4.1.3	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	25
4.1.4	DISEÑO DE ESQUEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
4.2	UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA.....	26
4.2.1	UNIVERSO.....	26
4.2.2	POBLACIÓN.....	26
4.2.3	MUESTRA.....	26
4.3	PROCESAMIENTO DE DATOS.....	27
4.4	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	27
4.5	VALIDACION DE LOS INSTRUMENTOS DE RECOJO DE INFORMACION	28
4.6	PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	28
CAPITULO V.....		30

RESULTADOS .....	30
DISCUSIONES .....	45
CONCLUSIONES .....	47
SUGERENCIAS.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
ANEXOS.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de edades de biopsias cutáneas y mucocutáneas para Leishmania sp. enero-junio del 2018.....	34
Tabla 2. Frecuencia de distribución por sexo de biopsias cutáneas y mucocutáneas para Leishmania sp. enero-junio del 2018.....	34
Tabla 3. Frecuencia de procedencia de lugar de probable contagio (Región), enero-junio del 2018.....	35
Tabla 4. Frecuencia de lugar de lesión cutánea y mucocutánea de biopsias cutáneas y mucocutáneas para Leishmania sp. enero-junio del 2018. ....	36
Tabla 5. Frecuencia de positivos y negativos por inmunohistoquímica y tinción hematoxilina-eosina en biopsias cutáneas y mucocutáneas para Leishmania sp. enero-junio del 2018. ....	37
Tabla 6. Total de datos evaluados para sensibilidad y especificidad.....	38
Tabla 7. Índice de sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica frente a la tinción hematoxilina-eosina para Leishmania sp, en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.....	39
Tabla 8. Total de datos evaluados del nivel de concordancia interobservador para el método inmunohistoquímico. ....	39
Tabla 9. Nivel de concordancia interobservador por el método inmunohistoquímica para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.....	40
Tabla 10. Índice de concordancia interobservador por el método inmunohistoquímica para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.....	40

Tabla 11. Índice de asociación por el método inmunohistoquímica para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018. ....	41
Tabla 12. Total de datos evaluados del nivel de concordancia interobservador por el método tinción hematoxilina-eosina. ....	41
Tabla 13. Nivel de concordancia interobservador por el método tinción hematoxilina-eosina para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.....	41
Tabla 14. Índice de concordancia interobservador por el método tinción hematoxilina-eosina para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.....	42
Tabla 15. Índice de asociación por el método de tinción hematoxilina-eosina para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.....	42
Tabla 16. Prueba de hipótesis- Kappa De Cohen .....	43
Tabla 17. Prueba de hipótesis- nivel de asociación entre inmunohistoquímica y tinción hematoxilina eosina. ....	44

## LISTA DE GRAFICOS

Grafico 1. Procesador de datos SPSS versión IBM 23.....	27
Grafico 2. Histograma de población distribuida por sexo.....	35
Grafico 3. Histograma de población distribuida según procedencia de lugar de probable contagio, enero a junio del 2018.....	36
Grafico 4. Histograma de población distribuida según lugar de lesión: cutánea y mucocutánea, enero a junio del 2018. ....	37
Grafico 5. Histograma de distribución de casos de muestras positivas y negativas, por inmunohistoquímica y hematoxilina-eosina. ....	38

## LISTA DE IMAGENES

Imagen 1. Corresponde a Fontes C, 2013 (7); se observan amastigotes de Leishmania sp. Utilizando suero de perro hiperinmune como anticuerpo primario con el método de la estreptavidina-biotina peroxidasa. ....	32
Imagen 2. Corresponde al autor de la presente investigación. Se observan amastigotes de Leishmania sp color marrón oscuro en fondo azul claro, lo que hace más evidenciable su identificación, basado en la misma tecnología de la estreptavidina biotina peroxidasa por el método inmunohistoquímica. Observado a 10 X. ....	32
Imagen 3. Amastigotes de Leishmania sp por tinción convencional hematoxilina-eosina. Observado a 40 X. ....	32
Imagen 4. Amastigotes de Leishmania sp por método inmunohistoquímico. Observado a 10 X. ....	33
Imagen 5. Se observa 1 amastigote de Leishmania sp de color marrón oscuro, por método inmunohistoquímico. Observado a 100 X. ....	33
Imagen 6. Marcaje IHQ. Amastigotes de Leishmania. Observado a 10 X. ....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ac:</b>	Anticuerpo
<b>Ag:</b>	Antígeno
<b>IHQ:</b>	Inmunohistoquímica
<b>H-E:</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>VN:</b>	Verdadero negativo
<b>VP:</b>	Verdadero positivo
<b>FN:</b>	Falso negativo
<b>FP:</b>	Falso positivo.
<b>IFI:</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>PBS:</b>	Buffer Fosfato Salino
<b>LTA:</b>	Leishmania tegumentária americana
<b>DAB:</b>	Diaminobencidina
<b>LVC:</b>	Leishmania visceral canina
<b>PAP:</b>	Peroxidasa Antiperoxidasa
<b>PCR:</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa

## **CAPITULO I**

### **1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA**

Según el Centro Nacional de Epidemiología y Control de Enfermedades- MINSA <sup>(4)</sup>, del año 2012 al 2017 presentado por número de casos según por cada departamento. En los últimos años la leishmaniasis ha ido convirtiéndose en un problema de salud pública reportando un 45.2% para los departamentos de: Cusco, Madre de Dios, Cajamarca y San Martín. Para el año 2017, el departamento del Cusco según el tipo de leishmaniasis; la lesión cutánea obtiene 632 casos y la lesión mucocutánea con 131 casos, haciendo un total de 763 casos en el año 2017.

Muchos autores de investigación, concuerdan que la coloración de rutina (hematoxilina-eosina) es poco sensible para la identificación parasitaria por la distorsión que sufren los parásitos por: la fijación, deshidratación y tinción, lo que hace más dificultosa su identificación parasitaria. En el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Regional Cusco, según el protocolo de trabajo para el diagnóstico de leishmaniasis, realizan solo la tinción básica hematoxilina-eosina, dificultando al médico anatómico patólogo el diagnóstico confirmatorio de esta enfermedad infecciosa como es la leishmaniasis, consultando a colegas médicos y/o personal profesional (Biólogo o Tecnólogo Médico) con experiencia en enfermedades tropicales.

Existen pocas investigaciones que aborden de forma específica y rigurosa en el empleo de anticuerpos en inmunohistoquímica contra *Leishmania* sp. Como menciona: Fernández, A (6). “Que la mayoría de los anticuerpos para

Leishmania sp no están comercializados ni estandarizados”. Bajo esta realidad problemática varios laboratorios han visto por conveniente producir sus propios anticuerpos contra la leishmaniasis y así cada patólogo debe ir familiarizándose.

Como menciona, Socorro (14): “Que la inmunohistoquímica (IHQ), se fundamenta en la detección de antígenos (Ag) in situ, presentes en los cortes de tejido, empleando anticuerpos que reconocen específicamente ese Ag”.

Es precisamente, por esta razón que se plantea la necesidad de emplear como anticuerpo primario, suero humano hiperinmune infectado naturalmente con Leishmania sp para su detección parasitaria en biopsias tegumentarias.

En tal efecto; para un mejor diagnóstico y así evitar complicaciones en su identificación parasitaria, es de suma importancia su diagnóstico con calidad y prontitud, estableciendo niveles que se adecuen a los recursos y/o facilidades con las que ya cuenta el laboratorio histopatológico, y uno de estos métodos diagnósticos que se pretende demostrar por su sensibilidad y especificidad en el diagnóstico parasitológico de la leishmaniasis en biopsias cutáneas y mucocutáneas es la inmunohistoquímica frente a la tinción convencional hematoxilina-eosina.

## **1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **1.2.1 PROBLEMA GENERAL**

¿Cómo validar la aplicación de la inmunohistoquímica como método diagnóstico para Leishmania sp en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?

### **1.2.2 PROBLEMAS ESPECÍFICOS**

- a) ¿Cuál es la sensibilidad de la aplicación de la inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, para el diagnóstico del parásito Leishmania sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?

- b) ¿Cuál es la especificidad de la aplicación de la inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional hematoxilina-eosina, para el diagnóstico del parasito Leishmania sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?
- c) ¿Cuál es el nivel de concordancia de resultados interobservador con la aplicación de la inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional hematoxilina-eosina, para el diagnóstico del parasito Leishmania sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?

### **1.3 FORMULACIÓN DE OBJETIVOS**

#### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Validar la inmunohistoquímica como método diagnóstico para Leishmania sp en relación a la tinción convencional hematoxilina-eosina en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018.

#### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Establecer la sensibilidad de la aplicación de la Inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, para el diagnóstico del parasito Leishmania sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018.
- b) Establecer la especificidad de la aplicación de la Inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, para el diagnóstico del parasito Leishmania sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018.
- c) Establecer el nivel de concordancia de resultados interobservador con la aplicación de la inmunohistoquímica en relación a la tinción

convencional hematoxilina-eosina, para el diagnóstico del parásito *Leishmania* sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?

## **1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.4.1 JUSTIFICACIÓN TEÓRICA**

Menciona la Organización Mundial de la Salud-OMS <sup>(2)</sup>. Esta es una enfermedad zoonótica que se transmite por la picadura de flebótomos infectados por leishmaniasis con más de 20 especies diferentes. Esta enfermedad se manifiesta de 3 formas: *Leishmania* cutánea, *Leishmania* mucocutánea y *Leishmania* visceral. La leishmaniasis afecta a personas con mala nutrición, inmunodeficientes, personas que se trasladan por buscar trabajo en zonas selváticas mineras y condiciones de su vivienda por falta de recursos económicos. La inmunohistoquímica es la técnica que permite detectar *in situ* componentes celulares y extracelulares (antígeno) por medio de anticuerpos específicos, empleando para ello un sistema de detección enzimático, siendo un método de diagnóstico con mayor impacto en la práctica de la anatomía patológica.

### **1.4.2 JUSTIFICACIÓN METODOLÓGICA**

Con la aplicación de este método diagnóstico inmunohistoquímico, nos permitirá identificar (*in situ*) la presencia de este parásito del género *Leishmania* sp facilitando su visualización por un producto final coloreado, con un diagnóstico adecuado y oportuno de la misma. Esta investigación permitirá generar conocimiento sobre este método diagnóstico para esta patología en nuestro medio, lo cual será eficaz al momento de ser fuente de consulta y/o referencia para estudios similares en el futuro.

### **1.4.3 JUSTIFICACIÓN SOCIAL**

Los resultados que se obtengan en este trabajo de investigación tienen relevancia social, puesto que permitirá el planteamiento e implementación de un nuevo método de diagnóstico para leishmaniasis en biopsias

cutáneas y mucocutáneas, mejorando la atención y facilitando la identificación parasitaria por el medico anatomo patólogo y/o personal encargado del área de anatomía patológica.

## **1.5 DELIMITACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

### **1.5.1 DELIMITACIÓN GEOGRÁFICA**

El estudio está referido al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Regional, sito en la Av. La Cultura del distrito de Wanchaq, Cusco. Donde se utiliza la tinción convencional hematoxilina-eosina para la detección de Leishmania sp.

### **1.5.2 DELIMITACIÓN TEMPORAL**

EL desarrollo de la investigación se ejecutara de enero a junio del 2018.

## **1.6 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN**

En el presente trabajo de investigación la principal limitación fue, que no se encontró antecedentes de investigación con respecto a la inmunohistoquímica para la detección de Leishmania sp empleando suero humano hiperimmune como anticuerpo primario.

## **1.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Se tomó los principios éticos de la Declaración de Helsinki del 2013, informando previamente al paciente sobre la presente investigación, guardando todos los derechos de reserva de identificación para la investigación biomédica. También se tomó en cuenta las consideraciones éticas que rige el Código de Ética del Colegio de Tecnólogos Médicos del Perú, establecido en su artículo 103° del año 2007.

## CAPITULO II

### 2 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

#### 2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Burna, A <sup>(5)</sup>. (Corrientes, Argentina, 2017), en su trabajo titulado: “**ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE LAS TÉCNICAS CONVENCIONALES E INMUNOHISTOQUÍMICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSIS CANINA**”. En la leishmaniosis visceral (LV), los parásitos también son identificados por a tinción Giemsa en cortes de tejido como: nódulos linfáticos, hígado, piel o bazo. Se considera como resultado positivo, la aparición de una sola célula parasitada. El diagnóstico puede no ser exitoso debido a la baja sensibilidad de las técnicas histológicas tradicionales para detectar el parásito. Los métodos inmunohistoquímicos para detección de *Leishmania sp* en tejidos son simples, no requieren equipamiento especial y son altamente sensibles y específicos. El objetivo de este estudio fue evaluar las técnicas consideradas más sensibles y específicas para el diagnóstico de *Leishmania sp* visceral. También se obtuvieron muestras por biopsia de piel proveniente del pabellón auricular, para coloración hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica. En los cortes histológicos se pudieron identificar amastigotes de *Leishmania sp* con la técnica inmunohistoquímica en el 100% de los casos. Por su parte, la coloración hematoxilina-eosina permitió detectar solamente un 65% de las muestras como positivas a la presencia de amastigotes. En el caso de bloques parafinados, la técnica inmunohistoquímica mostró mayor sensibilidad en la detección de amastigotes de *Leishmania sp*.

**Fernández, A** <sup>(6)</sup>. (Coruña-España, 2017), en su trabajo titulado: **“UN NUEVO ESCENARIO EN EL DIAGNÓSTICO INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA”**. Las lesiones cutáneas de la leishmaniasis son fáciles de diagnosticar cuando son clínicamente obvias o cuando los amastigotes son numerosos en la biopsia. Sin embargo, este no es siempre el caso. En casos difíciles, el diagnóstico de leishmaniasis requiere una herramienta confiable para identificar los microorganismos. La identificación del parásito mediante microscopio tiene una sensibilidad superior a la del cultivo, y a la técnica biomolecular PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), mejoran en gran medida la sensibilidad del diagnóstico. Alternativamente, la inmunohistoquímica se ha convertido en una alternativa asequible a la PCR. Varios laboratorios han producido sus propios anticuerpos contra *Leishmania* y parecen satisfechos con los resultados. Sin embargo, la mayoría de estos anticuerpos no están comercializados ni estandarizados. La patología también agradeció la inesperada positividad de los amastigotes con ciertos clones de anti-CD1a. Este último no mancha universalmente todas las especies de *Leishmania*, con una baja sensibilidad para las especies del Nuevo Mundo. En conclusión, aunque el anti-CD1a es un anticuerpo confiable para la detección de leishmaniasis, los patólogos deben familiarizarse con uno de los anticuerpos específicos contra *Leishmania* y globalizar su uso, estandarizando y adaptando la técnica.

**Fontes, C. “et. al”** <sup>(7)</sup>. (Minas Gerais-Brasil, 2013), en su trabajo titulado: **“LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA AMERICANA: EFICACIA DE UN PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICO PARA LA DETECCIÓN DE LEISHMANIA”**. Su objetivo fue innovar el método inmunohistoquímico (IHC) para el diagnóstico de ATL. Para este propósito, utilizamos el suero de un perro infectado naturalmente con *Leishmania (L) infantum* (suero hiperinmune canino) como el anticuerpo primario, seguido de un sistema de detección con un anticuerpo secundario biotinilado. El suero hiperinmune canino de un perro infectado naturalmente con *Leishmania (L.) infantum* se empleó como anticuerpo primario en un método de diagnóstico inmunohistoquímico utilizando estreptavidina-biotina peroxidasa. Para evaluar la especificidad de esta reacción, se llevaron a cabo ensayos de IHC que emplean dos anticuerpos monoclonales. Como la tecnología basada en polímeros consume menos tiempo y mano de obra

que el método IHC marcado con estreptavidina-biotina peroxidasa, comparamos los dos métodos para todas las muestras. Resultados: El método IHC detectó ATL en 67 de los 73 casos (91.8%). Los parásitos inmuno-etiquetados se detectaron principalmente dentro de los macrófagos, ya sea en la dermis superficial o profunda. La detección se vio facilitada por la tinción de alto contraste de amastigotes (marrón oscuro) contra el fondo azul claro. Se observó una tasa de detección más baja (71,2%) con los dos anticuerpos monoclonales de *Leishmania* en comparación con el suero hiperinmune canino. Esto puede deberse a una tinción de fondo inespecífica observada en todas las muestras histológicas que hace que la detección positiva sea más difícil. La mayor eficacia del suero hiperinmune canino en el método IHC se confirmó mediante el método que usa estreptavidina-biotina peroxidasa, así como con la tecnología basada en polímeros (sistema libre de biotina-avidina). Concluyeron, que los datos son alentadores con respecto a la validación de IHC como un método alternativo estándar para el diagnóstico de ATL.

**Burna A. “et. al”<sup>(5)</sup>. (Corrientes-Argentina, 2012)**, en su estudio titulado: **“LEISHMANIOSIS EN UN ZORRO (CERDOCYON THOUS) DEL ZOOLOGICO DE LA CIUDAD DE CORRIENTES”**, Se obtuvo a un zorro infectado con leishmaniosis naturalmente, para luego ser sacrificado con el objetivo de desarrollar los métodos de diagnóstico inmunohistoquímico, histoquímico y serológico. Para tal efecto los órganos extraídos se sumergieron previamente en formol tamponado al 10%. El resultado fue que a los amastigotes de *Leishmania* sp se identificaron dentro y fuera de los macrófagos mediante la inmunohistoquímica. En conclusión, se confirmó el diagnóstico de leishmaniosis por los métodos diagnósticos: inmunohistoquímico, histoquímico y serológico. También se concluyó que estas técnicas o métodos de diagnóstico permiten corroborar la identificación parasitaria reflejando gran sensibilidad y especificidad.

**Fonseca, L. “et. al”<sup>(8)</sup>. (La Habana-Cuba, 2011)** en su trabajo titulado: **“DETECCIÓN POR INMUNOHISTOQUÍMICA DE LEISHMANIA INFANTUM EN HÁMSTER INFECTADO EXPERIMENTALMENTE”**. El objetivo fue: determinar la utilidad de la técnica de inmunohistoquímica en la identificación de *Leishmania*. Para la identificación se desarrolló un protocolo de inmunohistoquímica en tejido

incluido en parafina y los resultados fueron: positivos para leishmaniosis en los cortes de tejido de los animales infectados. Se comparó con la tinción Giemsa, pero la inmunohistoquímica permitió observar menor cantidad o carga parasitaria, lo que revela gran sensibilidad. La conclusión, el método inmunohistoquímico fue específico para leishmania sp, evitó confusiones con otros microorganismos y mejoro la calidad de diagnóstico.

**Avalos, A. “et. al” (9). (San Lorenzo-Paraguay),** en su trabajo titulado: **“INMUNOMARCACIÓN DE LEISHMANIA SP. EN GARRAPATAS Y PIEL DE CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS CON LEISHMANIASIS VISCERAL CANINA”**. El objetivo fue determinar la presencia de Leishmania sp en garrapatas y piel de caninos naturalmente infectados con LVC. Se colectaron un total de 26 muestras de piel de la zona donde la garrapata se encontraba fijada, y las 26 garrapatas correspondientes. El procedimiento de IHQ fue con la utilización de suero canino hiperinmune como anticuerpo primario y sistema de detección a base de estreptavidina-biotina-peroxidasa disponible comercialmente (LSAB+ kit, Dako USA). La marcación fue revelada con diaminobencidina (DAB).

Los resultados que obtuvieron con la técnica de H&E, de 26 cortes histopatológicos de piel, solo en 16 cortes se pudo determinar la zona próxima de fijación de la garrapata. La inmunomarcación de amastigotes de Leishmania sp confirmó la presencia de dichos protozoarios en los 10 de 16 (62,5%) cortes de piel correspondientes a la zona próxima a la fijación de la garrapata. Si bien, la IHQ se caracteriza por tener mayor sensibilidad a la hora de demostrar la presencia de amastigotes de Leishmania sp e incrementa la posibilidad de detectar casos con cargas parasitarias bajas, en este trabajo no hubo aumento en el número de casos positivos en las zonas próximas a la fijación de la garrapata cuando se comparó con H&E, pero si constituyo una herramienta importante a la hora de determinar la intensidad de la carga parasitaria en dichas zonas.

En conclusión; en lo que respecta a técnica de IHQ, ésta fue más eficaz al momento de detectar la intensidad de la carga parasitaria en la zona próxima a la fijación de la garrapata en la piel de los caninos, demostrando una carga intensa en el 70% de los casos positivos. Si bien, la inmunohistoquímica constituyó una herramienta eficaz a la hora de confirmar presencia de amastigotes de Leishmania

sp y para establecer la intensidad de la carga parasitaria en la piel de caninos con LVC, en los cortes de garrapatas no obtuvo resultados satisfactorios debido a la intensa marcación inespecífica dificultando la evaluación de las láminas. Por lo tanto, esta técnica no es aplicable a cortes histológicos de garrapatas.

## **2.2 BASES LEGALES**

- LEY GENERAL DE LA SALUD. Ley numero: 26842. En su título preliminar XV, indica; El Estado debe promover la investigación científica y tecnológica en el área de las ciencias de la salud capacitando a los recursos humanos para el cuidado de la salud pública.
- LEY DEL TECNÓLOGO MEDICO. Ley 28456. De la naturaleza de la profesión. Artículo 8: La profesión universitaria de tecnología médica, al área de las ciencias de la salud y contribuirá con la investigación científica aplicando los conocimientos científicos de acorde a las exigencias sociales de nuestra realidad.
- LEY DEL TECNÓLOGO MEDICO. Ley 21291. De los fines del Colegio. Artículo 5 c). Promover e incentivar la investigación científica.

## **2.3 BASES TEÓRICAS**

### **2.3.1 LEISHMANIA**

“Son protozoarios del Phylum Sarcomastigophora, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae. Existen dos sub géneros de Leishmania: a) El sub genero Leishmania; los que desarrollan dentro del mosquito flebótomo en la parte media y anterior del tubo digestivo y b) el subgénero Viannia; los que se desarrollan en la parte posterior del tracto digestivo antes de trasladarse a la parte anterior del tubo digestivo” <sup>(10)</sup>.

Según Sánchez <sup>(11)</sup>. Esta enfermedad es producida por dípteros hematófagos que pertenecen a diferentes especies de flebótomos y/o lutzomyas, donde el ser humano y animales vertebrados, son el reservorio para la enfermedad llamada leishmaniosis. En el Perú, la leishmaniosis es la segunda endemia que afecta a doce departamentos de clima tropical y también es constituida como tercera

enfermedad mórbida luego de la malaria y la tuberculosis. Esta enfermedad endémica se localiza en los valles y andes a 600 y 3000 m.s.n.m. para el tipo de lesión cutánea y por debajo de los 2000 m.s.n.m para la lesión de tipo mucocutánea. Esta enfermedad produce secuelas destructivas, sobre todo la lesión mucocutánea ya que aísla al individuo de la sociedad creando un impacto socioeconómico negativo.

Menciona Zegarra <sup>(12)</sup>. En el Perú, la leishmaniosis es causada por el sub genero de *L. viannia guyanensis*, *L. viannia peruviana*, *L. viannia braziliensis* y otros. Cada especie mencionada causa distinta respuesta inmunológica y morbilidad. Las lesiones cutáneas y mucocutáneas dejan secuelas y/o cicatrices que tienden a curarse en un tiempo aproximado de 3 a 18 meses. Mientras que las lesiones viscerales causadas por *Leishmania Donovanii* y Chagasi, causan enfermedades irreversibles llegando a causar la muerte si no son tratados a tiempo.

### **2.3.1.1 CICLO BIOLÓGICO DE LA LEISHMANIA**

Menciona Sánchez <sup>(11)</sup>. El ciclo inicia cuando el vector ingiere sangre para alimentarse y el animal se encuentra infectado con leishmaniosis. El amastigote se transforma a promastigote en unas 24 a 48 horas para luego reproducirse por división binaria. En este estadio promastigote se adhieren a la pared intestinal por los hemidesmosomas y otros quedan libres en el lumen intestinal, por esto es que varía cada vector y especie de *Leishmania*. Después de la multiplicación en el lumen intestinal del mosquito, estos pasan o migran al esófago y faringe. Los Promastigotes son de forma piriforme o fusiforme y se movilizan por el flagelo que es tamaño de su cuerpo, su núcleo es céntrico y su cinetoplasto entre el núcleo, el rizonema es parte del cinetoplasto continuando con el flagelo. Este vector transmite entre 10 a 100 promastigotes al reservorio (ser humano o animal doméstico) a través de su proboscis al momento de alimentarse por acción de la picadura y cuando la proboscis se encuentra congestionada necesitara hacer varias picaduras.

### 2.3.1.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS CUTÁNEAS Y MUCOCUTÁNEAS

Según el Manual de Diagnóstico y Control de la Leishmaniasis en Centro América <sup>(13)</sup>. Existen tipos de lesiones cutáneas, mucocutáneas y viscerales.

Etiología.- La Leishmania cutánea y mucocutánea, son causadas por más de 22 especies del genero Leishmania que son patógenas para el hombre. En el continente Sudamericano, la leishmaniosis es causada por el sub genero de L. viannia guyanensis, L. viannia peruviana, L. viannia braziliensis y Leishmania panamensis. Estas especies son indistinguibles bajo el microscopio por lo que se requiere pruebas biomoleculares para su tipificación parasitaria.

- Signos y Síntomas.- “El tiempo de incubación aproximado es de 2 a 8 semanas. Estas picaduras se convierten en pápulas de color rojo que posteriormente se ulceran y tienen bordes bien definidos, esto posiblemente por la respuesta inmunológica” <sup>(10)</sup>. Puede que estas úlceras puedan tener infecciones secundarias por otros microorganismos. Para las lesiones mucosas su manifestación son el tabique nasal que puede perforarse e infiltrar hasta paladar, faringe y úvula ocasionando problemas como disfonía y disfagia.
- Diagnóstico clínico: Considerar sospechosamente positivas a todos los que presenten lesiones cutáneas y mucocutáneas procedentes de zonas endémicas para leishmaniasis.
- Diagnóstico en laboratorio: Para el diagnóstico de esta parasitosis se realizan los siguientes métodos:
  - a) Frotis directo
  - b) Inmunofluorescencia
  - c) Reacción en cadena de la polimerasa
  - d) Reacción de Montenegro

e) IFI (inmunofluorescencia indirecta)

f) ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

En el presente trabajo haremos énfasis en el estudio de la biopsia histopatológica, en la cual se propone como apoyo diagnóstico: La inmunohistoquímica comparado con el examen convencional, tinción hematoxilina-eosina.

### **2.3.2 MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO**

Socorro<sup>(14)</sup>. La inmunohistoquímica, procedimiento concebido originalmente por Coons, método que más ha revolucionado el campo de la Anatomía Patológica en los últimos 50 años, por su positivo impacto en el diagnóstico y manejo de los pacientes. Es un método de estudio con alta sensibilidad y especificidad, ello dependerá de varios factores, uno de los cuales, el más simple e importante corresponde con la fijación, problema de preocupación cotidiana en histopatología, pues su mala práctica atenta contra la calidad general de la biopsia y produce efectos negativos sobre el procesamiento inmunohistoquímico”.

“La inmunohistoquímica (IHQ), se fundamenta en la detección de antígenos (Ag) in situ, presentes en los cortes de tejido, empleando anticuerpos que reconocen específicamente ese Ag”<sup>(14)</sup>.

“La inmunohistoquímica aporta en Anatomía Patológica mayor precisión diagnóstica y añade información de interés pronóstico o terapéutico. Resulta fundamental en tres apartados: patología tumoral, enfermedades de patogenia inmune y enfermedades infecciosas”<sup>(16)</sup>.

#### **2.3.2.1 ANTICUERPOS**

Montuenga<sup>(15)</sup>. Las inmunoglobulinas (Ig) o anticuerpos son glucoproteínas presentes en el suero que son producidas por los linfocitos B maduros y células plasmáticas en respuesta a una estimulación antigénica. Poseen 4 cadenas polipeptídicas (dos pesadas y 2 ligeras) unidas por puentes de disulfuro. A su vez, cada cadena posee una región variable, cuya secuencia

de aminoácidos es característica de cada anticuerpo y constituye la región del anticuerpo que reconoce y se une al epítipo correspondiente, y otra región constante con la misma secuencia para cada clases de Ig de una especie. Los anticuerpos constituyen la base de las técnicas inmunohistoquímicas, ya que son la herramienta específica de detección del antígeno que se quiere localizar. Los anticuerpos se clasifican en dos grandes grupos: policlonales y monoclonales.

- **Policlonales:** Consisten en una mezcla de diferentes Inmunoglobulinas frente a distintos epítipos de un mismo antígeno y se obtienen por exposición de un vertebrado superior a dicho antígeno. Para la inmunización se inyecta al animal el antígeno procedente de una especie diferente, de forma que los linfocitos reaccionan generan una batería de inmunoglobulinas dirigidas frente a diversos epítipos de ese antígeno. Así se obtiene un conjunto de inmunoglobulinas que provienen de diferentes clones de linfocitos B y por tanto con distinta especificidad.

Ventaja de los Ac. Policlonales	Limitaciones de los Ac. Policlonales
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poseen un espectro de reactividad mayor que los monoclonales, ya que el antisuero contiene anticuerpo frente a distintos epítipos del antígeno.</li> <li>• Su forma de producción es más sencilla, rápida y barata que la de los anticuerpos monoclonales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reconocen varios epítipos de la misma molécula, por lo que existe mayor probabilidad de reacciones cruzadas.</li> <li>• La purificación de los antisueros es laboriosa.</li> </ul>

- **Monoclonales:** En este caso todos los anticuerpos del suero son idénticos, es decir, presentan la misma especificidad (reconocen un epítipo), ya que estos anticuerpos son producidos por células que provienen de un mismo linfocito B. Para su obtención, se inmuniza al animal con el antígeno frente al cual queremos obtener. El animal responde con una reacción policlonal frente a dicho antígeno. Se extrae el bazo del animal y se disgrega para obtener los linfocitos B. los linfocitos B se fusionan con células de mieloma (inmortales) en un medio de polietilenglicol que favorece la unión de

membranas. Estas células híbridas llamadas “hibridomas”, pueden crecer indefinidamente en cultivo y producir una gran cantidad de anticuerpo.

Ventaja de los Ac. Monoclonales	Limitaciones de los Ac. monoclonales
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suponen una fuente ilimitada de anticuerpo con una especificidad concreta, ya que los hibridomas se pueden congelar y después descongelar y volver a cultivar.</li> <li>• Presentan una alta especificidad (reconocen un solo epítipo), por lo que se reduce la posibilidad de que se produzcan reacciones cruzadas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La fijación y el procesamiento de las muestras sobre las que se va a aplicar la inmunohistoquímica pueden alterar el epítipo que reconoce el anticuerpo, en cuyo caso no se obtendrá reactividad.</li> <li>• Su alta especificidad puede limitar su aplicación en especies distintas a las de origen del Ag utilizado en la inmunización, ya que pueden existir pequeñas diferencias interespecificas que afecten al epítipo reconocido por el Ac.</li> <li>• El proceso de obtención es más laborioso y caro que el de los policlonales.</li> </ul>

Características de un buen antisuero para inmunohistoquímica:

- Alta especificidad por el antígeno en interés.
- Alta afinidad de unión ha dicho antígeno.
- Alto título o concentración de Ig, lo que permitirá una dilución de uso mayor, con el consiguiente ahorro económico. Además en el caso de los antisueros policlonales, los anticuerpos no deseados se diluirán, por lo que se evitara que se produzcan reacciones cruzadas.

### 2.3.2.2 CONSERVACIÓN DE LOS ANTISUEROS

“Cuando se recibe un antisuero, es conveniente dividirlo en alícuotas sin diluir. La alícuota en uso se mantiene a 4°C y el resto se conserva a menos

20°C. Si hay que conservar los antisueros diluidos a 4°C durante varios días (aunque no se recomienda) es conveniente añadir seroalbumina para evitar que las Ig se adhieran al tubo. También es recomendable añadir azida sódica para prevenir su contaminación con microorganismos”<sup>(17)</sup>.

### **2.3.2.3 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS**

Montuenga <sup>(17)</sup>. Las técnicas se pueden dividir en:

- a) Métodos directos: el antisuero primario (anticuerpo específico frente al antígeno que se quiere localizar) está marcado. Es el método más sencillo, ya que la reacción tiene lugar en un único paso.
- b) Métodos indirectos: Se basan en la antigenicidad de las inmunoglobulinas, lo que permite obtener antisueros anti-inmunoglobulina específicos de la especie. El anticuerpo primario no está marcado y es detectado posteriormente mediante un antisuero secundario marcado obtenido frente a Ig de la especie en la que se ha obtenido el primario.

Los métodos directos presentan problemas de tipo práctico, ya que es necesario marcar todo y cada uno de los antisueros primarios. Además de ser tedioso y caro, el proceso de marcaje puede alterar su reactividad y especificidad por la manipulación del antisuero primario.

Los métodos indirectos son más sensibles, ya que cada molécula de anticuerpo primario se pueden unir a varios anticuerpos secundarios, con lo que se amplificara su señal. Es decir, los antisueros secundarios son policlonales: reconocen distintos epítomos de las Ig del antisuero primario.

### **2.3.2.4 TÉCNICAS INMUNOENZIMATICAS EN INMUNOHISTOQUIMICA**

Como dice Montuenga <sup>(15)</sup>.Se utilizan enzimas como moléculas marcadoras para detectar la reacción antígeno-anticuerpo. En la gran mayoría se utilizan técnicas de tipo indirecto. Las enzimas más utilizadas son la peroxidasa,

fosfatasa alcalina. Estos marcadores se revelan utilizando los sustratos histoquímicos y los cromógenos diaminobencidina (DAB) adecuados, que dan lugar a productos coloreados insolubles, normalmente marrón-negro, que son fácilmente visibles al microscopio óptico de campo claro. Si existe una enzima endógena, debe ser inhibida (bloqueada) previamente de forma que pueda reaccionar y generar un precipitado que interfiera con el inmunomarcaje.

#### **2.3.2.5 METODO TECNOLOGIA POLIMERO DE COMPACTO**

Es un sistema de detección novedoso. Es una tecnología libre de estreptavidina/biotina, por lo que no causara reacciones cruzadas inespecíficas debido a la biotina endógena. Este sistema utiliza un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario y dextrano o polímero unidos al complejo PAP (Peroxidasa Antiperoxidasa).

#### **2.3.2.6 REACCIONES DEL SUSTRATO**

“Las enzimas son biocatalizadores y son el complemento de sustratos que se utiliza para acelerar una reacción. La peroxidasa reacciona con el peróxido de hidrogeno, en presencia de un electrón donante formara un complejo coloreado. Por ejemplo, un donador de electrón: la 3,3 diaminobencidina (DAB), produce un color marrón en el producto final” <sup>(17)</sup>.

### **2.3.3 MÉTODO TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA**

Según manual de ApliChen Reac <sup>(17)</sup>. Se da en 2 tiempos. Primero, se da una tinción nuclear básica y la segunda, por una tinción del citoplasma acido originado por la eosina. La hematoxilina teñirá los núcleos de color azul y negro acompañado de la coloración citoplasmática de color rosa o rojo ladrillo. La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateina, formada por oxidación de la hematoxilina.

#### **2.3.3.1 HISTOPATOLOGÍA DE LA LEISHMANIA**

Menciona Weedon <sup>(18)</sup>. Método de estudio utilizado para las formas cutáneas y mucocutáneas. En las lesiones agudas de las formas cutáneas, los

parásitos se encuentran alrededor de estructuras basofílicas ovales, de 2 a 4 um de tamaño y tienen un cinetoplasto localizado excéntricamente visibles en el intersticio o en el interior de los macrófagos en cortes finos teñidos con hematoxilina-eosina. En lesiones crónicas existe una reducción del número de macrófagos parasitados acompañado de un infiltrado leve a moderado de células mononucleares. En las formas recidivantes solo ocasionalmente se pueden encontrar los organismos si la búsqueda es muy cuidadosa. En las lesiones anérgicas diseminadas la infiltración está casi enteramente compuesta por macrófagos parasitados, con escasos linfocitos.

Según Sánchez <sup>(11)</sup>. Las lesiones cutáneas y mucocutáneas mostraran reacción inflamatoria granulomatosa. En las lesiones recientes se observaran células gigantes, plasmocitos, células epitelioides, macrófagos y ocasionales eosinófilos y linfocitos. También mostraran abscesos, hiperqueratosis y atrofia. Y en las lesiones antiguas se observaran histiocitos, células gigantes y escasos macrófagos parasitados.

“Con la técnica de inmunohistoquímica se logra identificar los parásitos en menor carga parasitaria cuando las tinciones de rutina son poco sensibles por los escasos parásitos” <sup>(19)</sup>.

Según el Manual de Diagnóstico y Control de la Leishmaniasis en Centro América <sup>(13)</sup>. En las biopsias tegumentarias cuando son coloreados por tinciones de rutina como la histoquímica (hematoxilina-eosina), nos permitirá identificar siempre en cuando haya mayor carga parasitaria de amastigotes de Leishmania. Pero en general es un método de detección poco sensible, esto por la distorsión que estos sufren el riguroso procesamiento que son sometidas las biopsias (formol, sustituto de xileno, inclusión por parafina y la coloración).

“La histoquímica o coloraciones convencionales poseen una sensibilidad limitada para la detección parasitaria, pudiendo variar su positividad en un 14 y 35 %. Esta baja sensibilidad es debido a la distorsión y la presencia de escasos amastigotes que puede haber en la biopsia. Estas biopsias sirven para hacer diagnósticos diferenciales de leishmaniosis con otras

enfermedades como: la de Hansen, infecciones por *Sporothrix schenckii* infecciones bacterianas y tuberculosis cutánea”<sup>(1)</sup>.

“Las técnicas convencionales acompañadas de información clínica suficiente, continúan siendo el fundamento del diagnóstico anatómico patológico”<sup>(14)</sup>.

#### **2.3.4 CONTROL DE CALIDAD - PROCEDIMIENTOS PARA LA DETECCIÓN DE ERRORES**

Según Sedano<sup>(20)</sup>. En los métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos, se requieren de elementos de juicio que nos permitan darle garantía a los resultados que se obtienen. Dentro de nuestros procedimientos se deben tener presentes las siguientes definiciones:

- Lamina patrón.- Se basa en que la reacción será de todas maneras será positiva para una reacción o método diagnóstico.
- Lamina problema.- se llama así a nuestra muestra problema del paciente, donde será sometido a una reacción o método de diagnóstico para confirmar su diagnóstico.
- Lamina blanco.- Se llama así en el que una muestra patrón será sometido a una reacción o método de diagnóstico y en el que uno de los pasos se omitirá para determinar falsos positivos.

#### **2.3.5 SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DIAGNÓSTICAS.**

Como dice la OIE<sup>(21)</sup>, los valores de sensibilidad y especificidad son parámetros más importantes que establecen la validación de una prueba, permitiendo un error del 5% en las estimaciones de la sensibilidad y especificidad. Normalmente no se recomienda reducir los niveles de confianza de sensibilidad y especificidad por debajo del 90%, permitiendo un error del 5% en las estimaciones de la sensibilidad y especificidad. La sensibilidad diagnóstica, es el porcentaje de personas enfermas con un resultado fuera del intervalo de referencia. Mide la capacidad de clasificar correctamente a una persona enferma como tal (VP). Y la especificidad diagnóstica, se refiere a la fracción de personas sanas con un

resultado dentro del intervalo de referencia. Mide la capacidad de clasificar correctamente a una persona sana (VN).

$$\text{Sensibilidad (\%)} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100$$

$$\text{Especificidad (\%)} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$$

Donde:

VP y FP= verdadero positivo y falso positivo.

VN y FN= verdadero negativo y falso negativo.

### 2.3.6 NIVEL DE CONCORDANCIA INTEROBSERVADOR-ÍNDICE KAPPA

“Mide el grado de acuerdos u observaciones, donde el valor de 1 corresponde a concordancia muy buena y valor 0 indica Ineficiente”, considerándose los siguientes valores del índice Kappa de Landis y Koch.

COEFICIENTE KAPPA	CATEGORÍA
< a 0.20	Ineficiente
21 a 0.40	Concordancia baja
0.41 a 0.60	Concordancia moderada
0.61 a 0.80	Concordancia buena
0.81 a 1.00	Concordancia muy buena

### 2.3.7 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- **Anticuerpo.-** son inmunoglobulinas (glucoproteínas) que se encuentran presentes en el suero producidos por los linfocitos B en respuesta a una estimulación antigénica <sup>(15)</sup>.
- **Antígeno.-** cualquier sustancia extraña que provoca e estimula una respuesta inmunitaria con la producción de anticuerpos <sup>(15)</sup>.
- **Biopsia.-** procedimiento médico quirúrgico, que consiste en la extracción de un trozo de tejido para un fin diagnóstico.<sup>(15)</sup>.
- **Enzima.-** son moléculas de naturaleza proteica que catalizan las reacciones químicas <sup>(15)</sup>.
- **Epítopo.-** es la región del antígeno que estimula la producción de anticuerpos y que será reconocida por este <sup>(15)</sup>.

## **CAPITULO III**

### **3 HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN**

##### **3.1.1 HIPÓTESIS GENERAL**

La inmunohistoquímica tiene validez diagnóstica para *Leishmania* sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional cusco – enero a junio del 2018.

#### **3.2 VARIABLES**

##### **3.2.1 VARIABLE INDEPENDIENTE 1.**

- Método de diagnóstico a través de la inmunohistoquímica.

##### **3.2.2 VARIABLE INDEPENDIENTE 2.**

- Método de diagnóstico a través de la tinción Hematoxilina-Eosina.

##### **3.2.3 VARIABLE DEPENDIENTE**

- Diagnóstico para *Leishmania* sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas.

##### **3.2.4 VARIABLES INTERVINIENTES**

- Edad, Sexo, Procedencia (probable lugar de contagio), Tipo de lesión (cutánea y mucocutánea), Tratamiento para leishmaniosis y Enfermedad diagnosticada.

### 3.2.5 OPERACIONALIZACIÓN DE LA VARIABLE

Variable	Naturaleza de la variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Unidad de medida	Escala de medición	Instrumento de medición
<i>Método para diagnóstico de Leishmania sp.</i>	cualitativa	El método clínico o "proceso del diagnóstico", son los pasos ordenados que todo profesional de la salud, aplica en la búsqueda del diagnóstico en sus enfermos individuales para la aplicación de un tratamiento en beneficio del individuo.	El método inmunohistoquímico, consiste en la detección y localización de antígenos <i>in situ</i> . Utiliza un anticuerpo primario, anticuerpo secundario y un anticuerpo unido a una enzima peroxidasa (complejo PAP) que produce un color marrón oscuro en esa reacción.	Método inmunohistoquímico	Presencia de amastigotes dentro y fuera de los macrófagos, la tinción de alto grado contraste de amastigotes color marrón oscuro contra el fondo oscuro	Se observan la presencia de amastigotes. (Positivo)  No se observa la presencia de amastigotes. (Negativo).	Nominal /positivo negativo	Ficha de análisis documental (resultados)
	cualitativa		Es una tinción convencional que se emplea en anatomía patológica para el estudio histopatológico. Es una técnica de gran ayuda para el diagnóstico diferencial de las lesiones cutáneas diferentes a leishmaniasis.	Método Hematoxilina-Eosina	Amastigotes color azul, dentro y fuera de los macrófagos de 2 a 4 um. contra un fondo azul	· Se observan la presencia de amastigotes. (Positivo).  · No se observa la presencia de amastigotes. (Negativo).	Nominal /positivo negativo	Ficha de análisis documental (resultados)

VARIABLES	NATURALEZA DE LA VARIABLE	INDICADORES	CATEGORIA/ MEDIDA	ESCALA	INSTRUMENTO DE MEDICION
Edad	Cualitativa	Años	Valor	Razón	Ficha de recolección de datos/Historia clínica
Sexo	Cualitativa	Caracteres sexuales secundarios	Masculino Femenino	Nominal	Ficha de recolección de datos/Historia clínica
Probable lugar de infección	Cualitativa	Región	Cusco Madre de Dios Otros	Nominal	Ficha de recolección de datos/Historia clínica
Lugar de lesión	Cualitativa	Examen clínico	Cutánea Mucocutánea	Nominal	Ficha de recolección de datos/Historia clínica
Antecedente de tratamiento para leishmania	Cualitativa	Presencia	Si/No	Nominal	Ficha de recolección de datos/Historia clínica
Enfermedad diagnosticada	Cualitativa	Presencia	Si/No	Nominal	Ficha de recolección de datos/Historia clínica

## **CAPITULO IV**

### **4 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **4.1 TIPO NIVEL Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

El siguiente trabajo es de tipo comparativo, transversal porque nos permitirá analizar en un tiempo determinado.

##### **4.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación es de enfoque cualitativo, comparativo porque se interesó en el grado de relación existente de dos variables de estudio.

##### **4.1.2 NIVEL DE INVESTIGACIÓN**

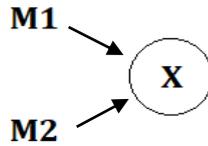
De acuerdo a su naturaleza es descriptiva-explicativa; porque busca describir las principales características y/u otro fenómeno que se sometió a un análisis diagnóstico.

##### **4.1.3 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

Es diseño no experimental, porque en dicho estudio las variables carecen de manipulación intencional, porque solo se analizan y estudian los hechos y fenómenos de la realidad después de la ocurrencia.

##### **4.1.4 DISEÑO DE ESQUEMA DE LA INVESTIGACIÓN**

El diseño es de esquema transversal, porque se analizara las variables en un momento y punto de tiempo dado.



Donde:

M1= variable independiente 1

M2= variable independiente 2

X = Variable dependiente

## **4.2 UNIVERSO, POBLACIÓN Y MUESTRA**

### **4.2.1 UNIVERSO**

Pacientes que acuden al Hospital Regional Cusco y son atendidos en consultorios externos (atendido por diferentes especialistas de la salud), que posteriormente son derivados al servicio de Anatomía patológica con su respectiva biopsia cutánea o mucocutánea.

### **4.2.2 POBLACIÓN**

Según el registro de solicitudes de estudio anatómico patológico de biopsias cutáneas y mucocutáneas para descartar leishmaniasis de enero a junio del año 2018, suman un total de 53 casos.

### **4.2.3 MUESTRA**

Se considerará una muestra no probabilística de tipo censal por conveniencia.

#### **4.2.3.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

##### a) Criterios de inclusión

Muestras de biopsias cutáneas y mucocutáneas recepcionadas por el Servicio de Anatomía Patológica con diagnóstico positivo, negativo y

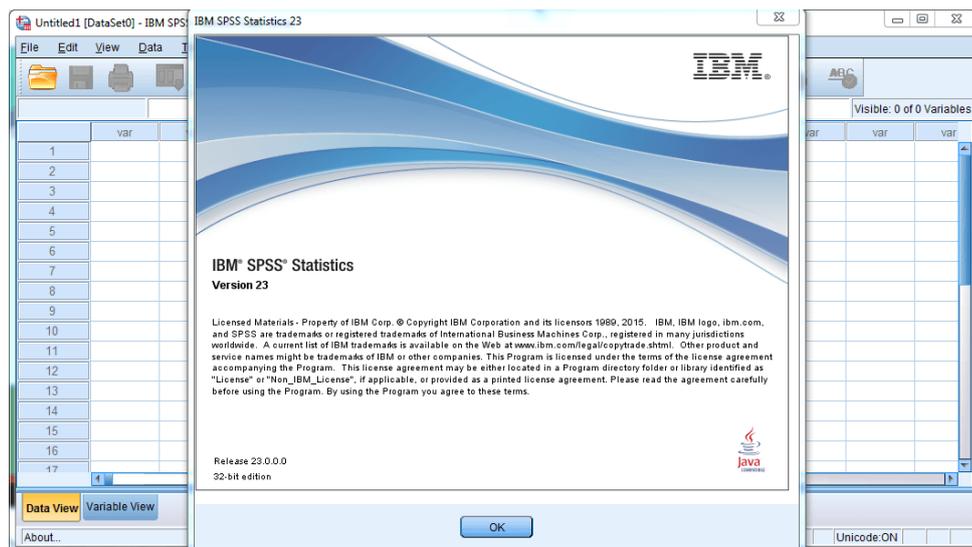
presuntivo de Leishmania sp diagnosticados por tinción hematoxilina-eosina en el Hospital Regional Cusco – enero a junio del 2018.

b) Criterios de exclusión

Muestras de biopsias cutáneas y mucocutáneas insuficientes para estudios complementarios del proyecto de investigación, y biopsias derivadas por otras patologías excluyentes para Leishmania sp.

### 4.3 PROCESAMIENTO DE DATOS

Se realizó el procesamiento de los datos obtenidos de la ficha de resultados, elaborando una base de información con apoyo del sistema computarizado: paquete estadístico SPSS versión IBM 23 para Windows.



**Grafico 1. Procesador de datos SPSS versión IBM 23**

### 4.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

- a. Técnicas.
  - 1) Recolección de datos clínicos.
  - 2) Análisis documental.
- b. Instrumentos.
  - 1) Fichas de instrumento de recolección de datos clínicos.
  - 2) Fichas de análisis documental (resultados).

#### **4.5 VALIDACION DE LOS INSTRUMENTOS DE RECOJO DE INFORMACION**

La validación de los instrumentos de recojo de resultados de la presente investigación que tiene como título: “validación de la inmunohistoquímica como método diagnóstico para *Leishmania* sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el hospital regional cusco - enero a junio del 2018”, fue revisado y validado por dos expertos: Medico Anatómico Patólogo y Lic. Tecnólogo Médico, entendidos en el área cuya experiencia y grado académico corresponde la posibilidad de evaluar, revisar y dar conformidad del uso de los instrumentos para la recolección de resultados de investigación, el mismo que plasma su sello y rubrica en señal de conformidad (Anexo-11).

#### **4.6 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS**

Una vez realizada las coordinaciones respectivas con las autoridades del Hospital Regional del Cusco y Servicio de Anatomía Patológica, se revisaron las solicitudes de estudio anatómico patológico con diagnóstico negativo y positivo para leishmaniasis, seguidamente se procedió con la búsqueda de la biopsia en bloque de parafina. Posteriormente se procedió a preparar los cortes de bloque en parafina, para el método inmunohistoquímico.

Para la aplicación del método inmunohistoquímico se utilizó suero humano hiperinmune como Ac primario, de un paciente infectado naturalmente por *Leishmania* sp procedente de la Región de Madre de Dios, con un título de anticuerpos de 1/320, diagnosticado por IFI (inmunofluorescencia Indirecta-Anexo 10). La obtención del suero sanguíneo fue previo consentimiento del paciente respetando el código de ética deontológico.

El suero hiperinmune fue alicuotado en crio viales y congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para su empleo en el método inmunohistoquímico como Ac primario, se llevó a temperatura ambiente por unos 30 minutos. Previo a las pruebas experimentales se llevó a una pre dilución con tampón PBS (Buffer Fosfato Salino) a pH 7.2 en: 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320 (Anexo 14), obteniendo resultados satisfactorios en todas las diluciones. Para el presente trabajo se utilizó la dilución de 1/80. Para el control de calidad, se elaboró un control positivo (en

que sabemos de antemano que de todas maneras la inmunohistoquímica debe ser positiva), control blanco (en el que uno de los pasos se omite: anticuerpo primario) y control negativo (muestra de biopsia tegumentaria de otra patología).

El procedimiento ha sido desarrollado según el protocolo empleado por el Servicio de Anatomía Patológica en sus demás métodos diagnósticos inmunohistoquímicos en patología tumoral. (Anexo 13).

Para la evaluación diagnóstica, se realizó en dos etapas: una primera; de láminas con tinción hematoxilina-eosina y la segunda de láminas de inmunohistoquímica, dicha validación de resultados, fue: por dos médicos Anatómicos Patólogos del Hospital Regional Cusco y del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN).

Todos los resultados obtenidos fueron recolectados en los instrumentos validados por los expertos.

## MATERIALES

- Láminas silanizadas (inmunohistoquímica).
- Cubreobjetos 22 mm. x 40 mm. y 22 mm. x 22 mm.
- Pipetas Pasteur.

## REACTIVOS

- Kit de reactivos para inmunohistoquímica Novocastra (tampón PBS, recuperador de antígenos, peróxido de hidrógeno, anticuerpo secundario, polímero, cromógeno DAB + substrato).

## EQUIPOS

- Micróscopo Leica automático.
- Baño maría de 0 - 100°C.
- Microscopio óptico OLYMPUS CX31.
- Incubadora Memmert 0 – 80°C.

## **CAPITULO V**

### **RESULTADOS**

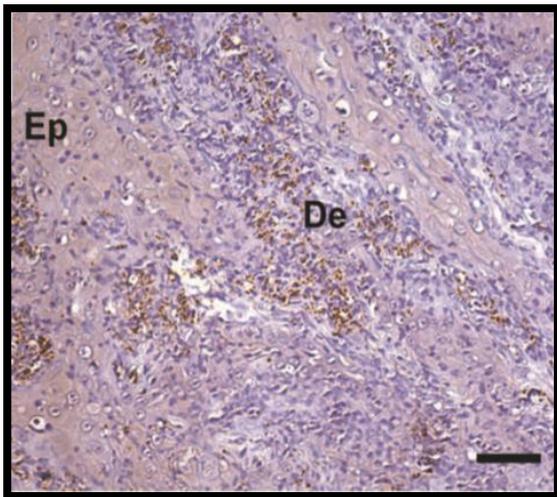
En el siguiente trabajo de investigación. La población en su mayoría presentan rango de edad promedio de 24 a 57 años; representado por 42 (79.2%) del total de 53 muestras (100%). Dichas muestras pertenecen en su totalidad a pacientes de sexo masculino con 51 casos (96.2%) y 2 casos (3.8%) a pacientes de sexo femenino. Por la procedencia de lugar de probable contagio; La Región Cusco está representado por 25 muestras (47.2%), Madre de Dios con 25 muestras (47.2%) y provenientes de otros lugares con 3 muestras (5.7%).

Mediante la inmunohistoquímica se detectaron 24 muestras positivas para *Leishmania* sp con una tasa de 45.3 % y 29 muestras negativas con una tasa de 54.7%, del total de 53 muestras de biopsia (100%). Y por la tinción hematoxilina-eosina se detectó 25 muestras positivas para *Leishmania* sp con una tasa de 47.2% y 28 muestras negativas con una tasa de 52.8%, del número total de 53 muestras de biopsia (100%). Para ambos métodos fue de 23 muestras positivas (verdadero positivo), 27 muestras fueron negativas (verdadero negativo), 1 muestra fue positiva para el método inmunohistoquímico y negativo para hematoxilina-eosina (falso positivo), y 2 muestras positivas para el método hematoxilina –eosina y negativa para inmunohistoquímica (falso negativo). Obtenido el resultado por ambos métodos; se puede clasificar a 23 pacientes con leishmaniasis por la capacidad del método para detectar la enfermedad y 27 pacientes no presentan la patología de leishmaniasis.

Los resultados obtenidos de concordancia interobservador para el método inmunohistoquímico (observador “A” y observador “B”) fue de 0.77; según el índice de Kappa es de: “concordancia buena”. Obteniendo resultados de 22 muestras positivas y 25 muestras negativas para *Leishmania* sp., 2 muestras negativas para el

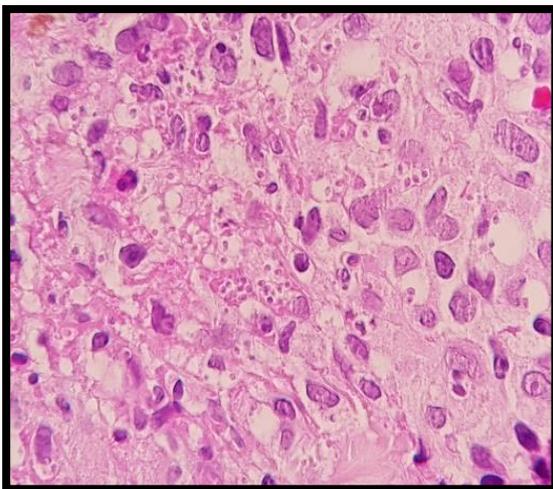
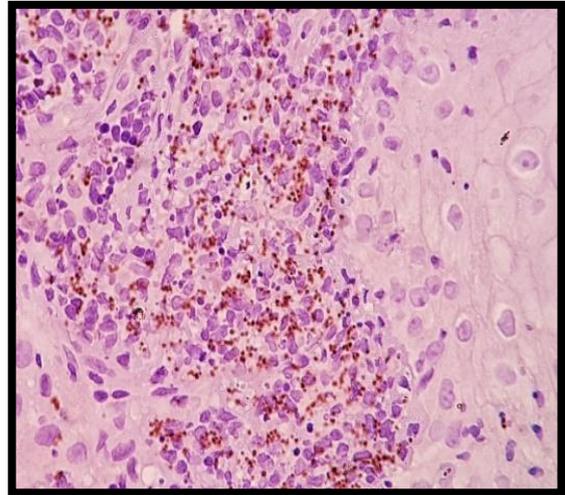
observador "A" y positivas para el observador "B", y 4 muestras positivas para el observador "A" y negativas para el observador "B".

Y los resultados obtenidos de concordancia interobservador para el método de tinción hematoxilina-eosina (observador "A" y observador "B") fue de 0.349; según el índice de Kappa es de: "concordancia baja". Obteniendo resultados de 14 muestras positivas y 22 muestras negativas para *Leishmania* sp., 11 muestras negativas para el observador "A" y positivas para el observador "B", y 6 muestras positivas para el observador "A" y negativas para el observador "B".

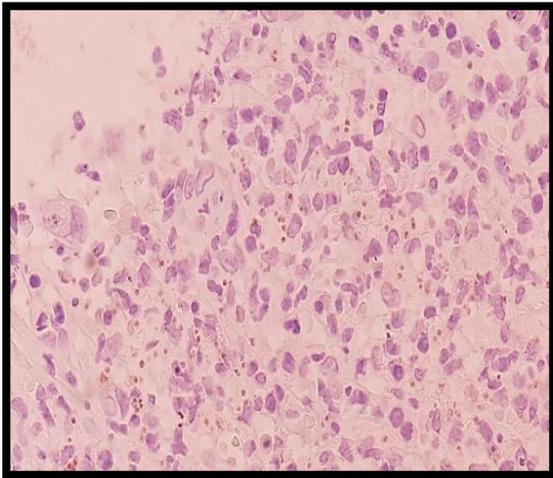


**Imagen 1.** Corresponde a Fontes C, 2013 (7); se observan amastigotes de *Leishmania* sp. Utilizando suero de perro hiperinmune como anticuerpo primario con el método de la estreptavidina-biotina peroxidasa.

**Imagen 2.** Corresponde al autor de la presente investigación. Se observan amastigotes de *Leishmania* sp color marrón oscuro en fondo azul claro, lo que hace más evidenciable su identificación, basado en la misma tecnología de la estreptavidina biotina peroxidasa por el método inmunohistoquímica. Observado a 10 X.

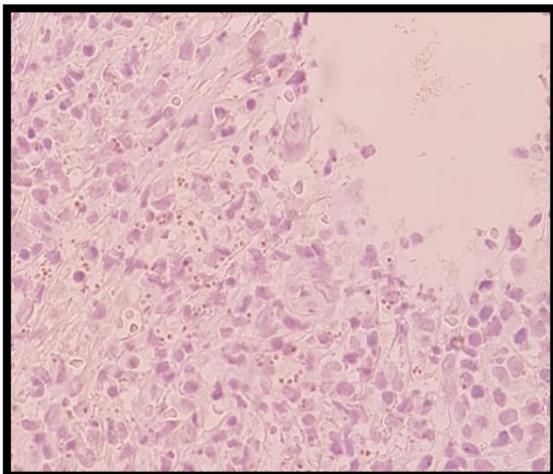
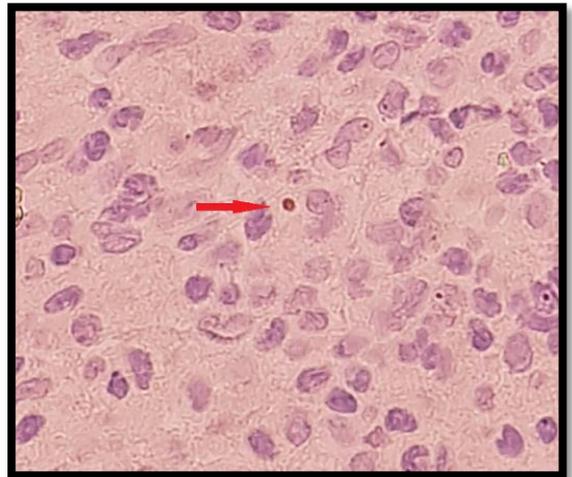


**Imagen 3.** Amastigotes de *Leishmania* sp por tinción convencional hematoxilina-eosina. Observado a 40 X.



**Imagen 4.** Amastigotes de Leishmania sp por método inmunohistoquímico. Observado a 10 X.

**Imagen 5.** Se observa 1 amastigote de Leishmania sp de color marrón oscuro, por método inmunohistoquímico. Observado a 100 X.



**Imagen 6.** Marcaje IHQ. Amastigotes de Leishmania. Observado a 10 X.

**Tabla 1. Frecuencia de edades de biopsias cutáneas y mucocutáneas para Leishmania sp. enero-junio del 2018.**

		EDAD (agrupado)			
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	[13 - 24>	5	9,4	9,4	9,4
	[24 - 35>	14	26,4	26,4	35,8
	[46 -57>	28	52,8	52,8	88,7
	[57 - 68>	5	9,4	9,4	98,1
	[79 - 90]	1	1,9	1,9	100,0
	Total	53	100,0	100,0	

Elaboración propia

**Interpretación:**

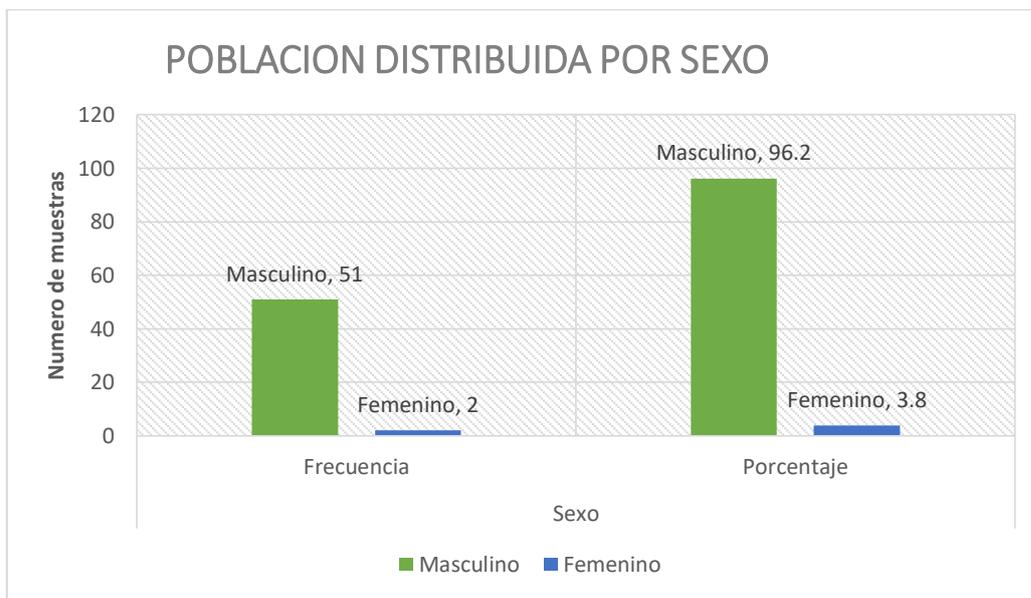
Existe un claro predominio en la edad adulta, particularmente entre los 46-57 años con una población de 28 pacientes que representan el 52.8%, de 24-35 años con frecuencia de 14 pacientes que representan 26.4%, mientras que los grupos 13-24 y 57-68 integran el 9.4% y la tasa más baja con apenas 1.9% de toda la población de 53 muestras que forman el 100%.

**Tabla 2. Frecuencia de distribución por sexo de biopsias cutáneas y mucocutáneas para Leishmania sp. enero-junio del 2018.**

	Sexo	
	Frecuencia	Porcentaje
Masculino	51	96.2
Femenino	2	3.8
Total	53	100

Elaboración propia

**Grafico 2. Histograma de población distribuida por sexo**



Elaboración propia

**Interpretación:**

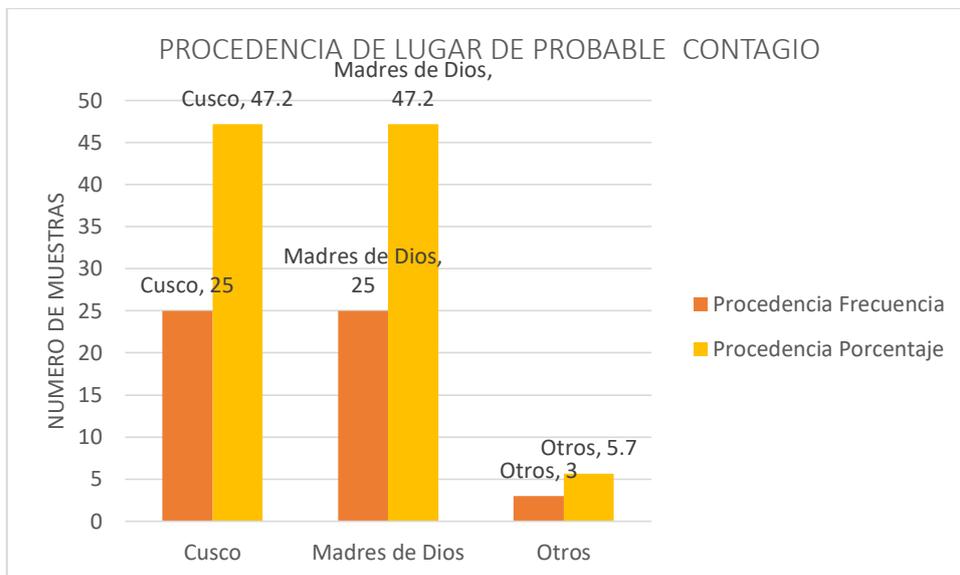
La mayor frecuencia y porcentaje por distribución de sexo, está constituido por una frecuencia de 51 pacientes masculinos que representa el 96.2 % y pacientes femeninos con frecuencia de 2 que representa el 3.8 %.

**Tabla 3. Frecuencia de procedencia de lugar de probable contagio (Región), enero-junio del 2018.**

	Procedencia	
	Frecuencia	Porcentaje
Cusco	25	47.2
Madres de Dios	25	47.2
Otros	3	5.7
Total	53	100.0

Elaboración propia

**Grafico 3. Histograma de población distribuida según procedencia de lugar de probable contagio, enero a junio del 2018.**



Elaboración propia

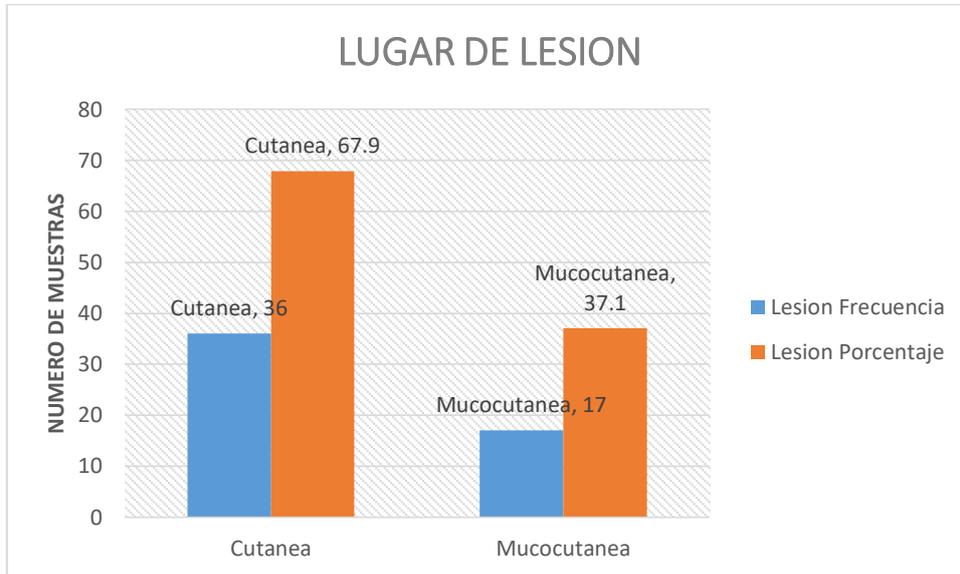
**Interpretación:**

Por la procedencia de lugar de probable contagio: Cusco tiene 25 pacientes que representa el 47.2%, Madre de Dios con 25 pacientes que representan 47.2 % y de otros lugares con 3 pacientes que representan el 5.7%.

**Tabla 4. Frecuencia de lugar de lesión cutánea y mucocutánea de biopsias cutáneas y mucocutáneas para Leishmania sp. enero-junio del 2018.**

	Lesión	
	Frecuencia	Porcentaje
Cutánea	36	67.9
Mucocutánea	17	37.1
Total	53	100

**Grafico 4. Histograma de población distribuida según lugar de lesión: cutánea y mucocutánea, enero a junio del 2018.**



Elaboración propia

**Interpretación:**

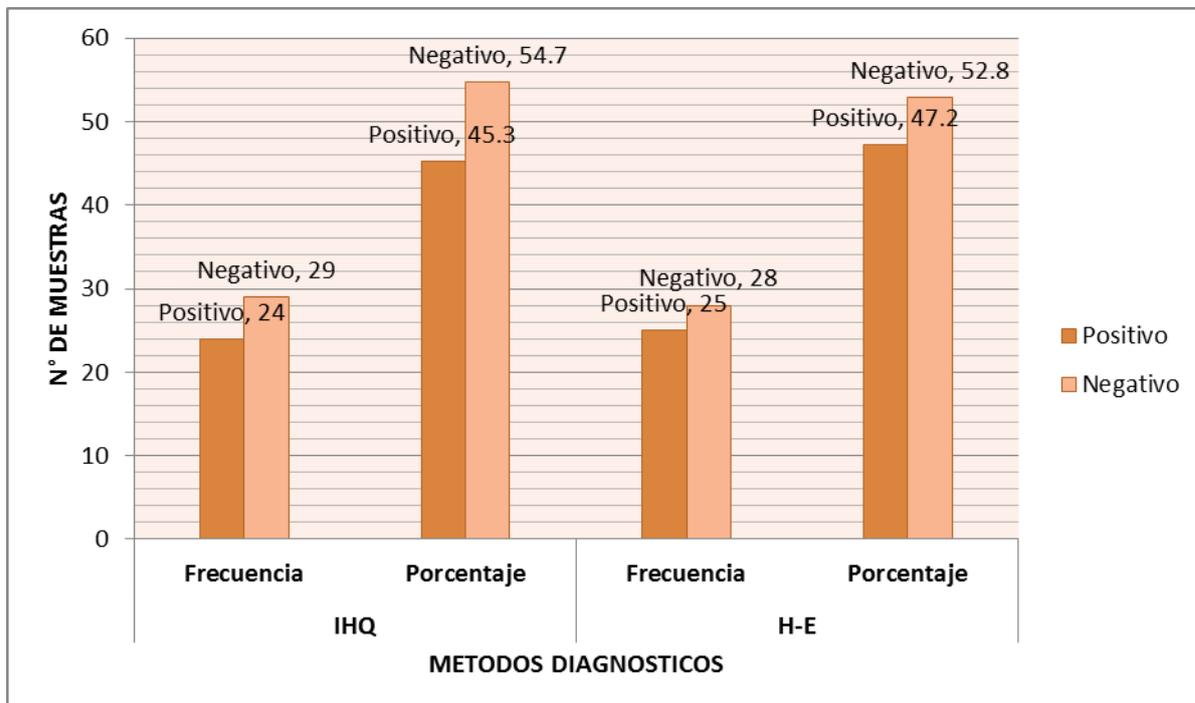
Por el lugar de lesión: cutánea y mucocutánea. Las lesiones cutáneas tienen una frecuencia de 36 que representan 67.9% y las lesiones mucocutáneas con frecuencia de 17, representan el 37.1%.

**Tabla 5. Frecuencia de positivos y negativos por inmunohistoquímica y tinción hematoxilina-eosina en biopsias cutáneas y mucocutáneas para Leishmania sp. enero-junio del 2018.**

	IHQ		H-E	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
<b>Positivo</b>	24	45.3	25	47.2
<b>Negativo</b>	29	54.7	28	52.8
<b>Total</b>	53	100.0	53	100.0

Elaboración propia

**Grafico 5. Histograma de distribución de casos de muestras positivas y negativas, por inmunohistoquímica y hematoxilina-eosina.**



Elaboración propia

**Interpretación:**

Con la aplicación del método inmunohistoquímico se detectaron 24 muestras positivas para *Leishmania sp* que representa el 45.3%, y 29 muestras negativas para *Leishmania sp* que representa el 54.7%. Por el método tinción hematoxilina-eosina se detectaron 25 muestras positivas para *Leishmania sp* que representa el 47.2%, y 28 muestras negativas para *Leishmania sp* que representa el 52.8%.

**Tabla 6. Total de datos evaluados para sensibilidad y especificidad.**

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
<b>IHQ * H-E</b>	53	100,0%	0	0,0%	53	100,0%

Elaboración propia

**Tabla 7. Índice de sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica frente a la tinción hematoxilina-eosina para Leishmania sp, en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.**

			H-E		Total
			Positivo	Negativo	
IHQ	Positivo	Recuento	23	1	24
		% dentro de H-E	92,0%	3,6%	45,3%
	Negativo	Recuento	2	27	29
		% dentro de H-E	8,0%	96,4%	54,7%
Total	Recuento	25	28	53	
	% dentro de H-E	100,0%	100,0%	100,0%	

Elaboración propia

**Interpretación:**

Tenemos 53 muestras, el total de casos positivos para ambos métodos: inmunohistoquímica y hematoxilina-eosina, fue de 23 que da una sensibilidad del 92%, y el total de muestras negativas para ambos métodos fue de 27, dando una especificidad de 96.4%.

**Tabla 8. Total de datos evaluados del nivel de concordancia interobservador para el método inmunohistoquímico.**

**Resumen de procesamiento de casos**

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaj e	N	Porcentaj e	N	Porcentaj e
IHQ-OBS "A" *IHQ- OBS "B"	53	100,0%	0	0,0%	53	100,0%

Elaboración propia

**Tabla 9. Nivel de concordancia interobservador por el método inmunohistoquímica para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.**

		IHQ-OBS "A"		Total
		Positivo	Negativo	
IHQ- OBS "B" Positivo	Recuento	22	2	24
	% del total	41,5%	3,8%	45,3%
Negativo	Recuento	4	25	29
	% del total	7,5%	47,2%	54,7%
Total	Recuento	26	27	53
	% del total	49,1%	50,9%	100,0%

Elaboración propia

**Interpretación:**

La tabla representa, el nivel de concordancia para el método inmunohistoquímico, entre el observador "A" y observador "B", diagnosticando 22 muestras positivas para Leishmania sp y 25 muestras negativas para Leishmania sp.

**Tabla 10. Índice de concordancia interobservador por el método inmunohistoquímica para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.**

	Valor	Error estandarizado asintótico <sup>a</sup>	T aproximada <sup>b</sup>	Significación aproximada
Medida de Kappa acuerdo	,773	,087	5,645	,000
N de casos válidos	53			

Elaboración propia

**Interpretación:**

De acuerdo a los resultados obtenidos por ambos expertos (Observador A y Observador B), el coeficiente Kappa obtenido es de 0.773, y si establecemos dentro de nuestra tabla de categorías tienen una "Concordancia Buena", para la identificación del parásito Leishmania sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas, por el método diagnóstico inmunohistoquímico.

**Tabla 11. Índice de asociación por el método inmunohistoquímica para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.**

Prueba de chi-cuadrado					
	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	31,866 <sup>a</sup>	1	,000		
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	28,826	1	,000		
Razón de verosimilitud	36,418	1	,000		
Prueba exacta de Fisher				,000	,000
Asociación lineal por lineal	31,265	1	,000		
N de casos válidos	53				

Elaboración propia

**Tabla 12. Total de datos evaluados del nivel de concordancia interobservador por el método tinción hematoxilina-eosina.**

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaj e	N	Porcentaj e	N	Porcentaj e
H-E/OBS "A" * H-E/OBS "B"	53	100,0%	0	0,0%	53	100,0%

Elaboración propia

**Tabla 13. Nivel de concordancia interobservador por el método tinción hematoxilina-eosina para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.**

			HE- OBS "A"		Total
			Positivo	Negativo	
HE- OBS "B"	Positivo	Recuento	14	11	25
		% del total	26,4%	20,8%	47,2%
	Negativo	Recuento	6	22	28
		% del total	11,3%	41,5%	52,8%
Total		Recuento	20	33	53
		% del total	37,7%	62,3%	100,0%

Elaboración propia

**Interpretación:**

La tabla representa, el nivel de concordancia para el método de tinción hematoxilina-eosina, entre el observador "A" y observador "B", diagnosticando 14 muestras positivas para Leishmania sp y 22 muestras negativas para Leishmania sp.

**Tabla 14. Índice de concordancia interobservador por el método tinción hematoxilina-eosina para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.**

	Valor	Error estandarizado asintótico <sup>a</sup>	T aproximada <sup>b</sup>	Significación aproximada
Medida de Kappa de acuerdo	,349	,127	2,592	,010
N de casos válidos	53			

Elaboración propia

**Interpretación:**

De acuerdo a los resultados obtenidos por ambos expertos (Observador A y Observador B), el coeficiente Kappa obtenido es de 0.349, y si establecemos dentro de nuestra tabla de categorías tienen una “Concordancia Baja”, para la identificación del parásito Leishmania sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas, por el método de tinción convencional hematoxilina-eosina.

**Tabla 15. Índice de asociación por el método de tinción hematoxilina-eosina para Leishmania sp., en biopsias cutáneas y mucocutáneas, periodo; enero a junio del 2018.**

**Prueba de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,718 <sup>a</sup>	1	,010		
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	5,328	1	,021		
Razón de verosimilitud	6,859	1	,009		
Prueba exacta de Fisher				,012	,010
Asociación lineal por lineal	6,592	1	,010		
N de casos válidos	53				

Elaboración propia

**Tabla 16. Prueba de hipótesis- Kappa De Cohen**

El ritual de la significancia estadística

<b>1</b>	<p><b>Plantear la hipótesis</b></p> <p><b>H0:</b> El método diagnóstico de inmunohistoquímica para la detección de Leishmania sp, no tiene concordancia inter observador frente a la tinción convencional Hematoxilina Eosina</p> <p><b>H1:</b> El método diagnóstico de inmunohistoquímica para la detección de Leishmania sp, tiene concordancia inter observador frente a la tinción convencional Hematoxilina Eosina</p>
<b>2</b>	<p><b>Establecer el nivel de significancia</b></p> <p>Nivel de significancia (alfa) <math>\alpha</math>: 5% (0.05)</p>
<b>3</b>	<p><b>Seleccionar el estadístico de la prueba</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a) <b>Kappa de Cohen</b></li> <li>b) Correlación de Spearman</li> <li>c) R de Pearson</li> <li>d) Análisis de varianza</li> </ul>
<b>4</b>	<p><b>Valor de P= 0,000 inferior al 5%</b></p> <p><b>Lectura del valor p:</b> con una probabilidad de error inferior al 5%.</p>
<b>5</b>	<p><b>Toma de decisiones</b></p> <p>Método diagnóstico de inmunohistoquímica para la detección de Leishmania sp, tiene concordancia inter observador frente a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, expresado con un índice de kappa de 0,773 (Buena concordancia), por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H0).</p>

Elaboración propia

**Tabla 17. Prueba de hipótesis- nivel de asociación entre inmunohistoquímica y tinción hematoxilina eosina.**

Chi Cuadrado

El ritual de la significancia estadística

<b>1</b>	<p><b>Plantear la hipótesis</b></p> <p><b>H0:</b> El método diagnóstico de inmunohistoquímica para la detección de Leishmania sp, no tiene nivel de asociación frente a la tinción convencional Hematoxilina Eosina</p> <p><b>H1:</b> El método diagnóstico de inmunohistoquímica para la detección de Leishmania sp, tiene nivel de asociación frente a la tinción convencional Hematoxilina Eosina</p>
<b>2</b>	<p><b>Establecer el nivel de significancia</b></p> <p>Nivel de significancia (alfa) <math>\alpha</math>: 5% (0.05)</p>
<b>3</b>	<p><b>Seleccionar el estadístico de la prueba</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>e) Kappa de Cohen</li> <li><b>f) Chi cuadrado</b></li> <li>g) R de Pearson</li> <li>h) Análisis de varianza</li> </ul>
<b>4</b>	<p><b>Valor de P= 0,000 inferior al 5%</b></p> <p><b>Lectura del valor p:</b> con una probabilidad de error inferior al 5%.</p>
<b>5</b>	<p><b>Toma de decisiones</b></p> <p>Método diagnóstico de inmunohistoquímica para la detección de Leishmania sp, tiene un gran nivel de asociación frente a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, expresado con un chi cuadrado 31,866 y un nivel de significancia de 0,00 inferior al 5%, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H0).</p>

Elaboración propia

## DISCUSIONES

La mayoría de los casos de estudio provienen de las Zonas selváticas de la Región del Cusco y Madre de Dios, coincidiendo con el Centro Nacional de Epidemiología y Control de Enfermedades- MINSA (4). Encontramos que la edad y el sexo constituyen factores de riesgo para leishmaniasis teniendo predominancia en el sexo masculino en una edad promedio: entre los 24 a 57 años, principalmente varones, ya que estos incursionan mayormente en áreas endémicas exponiéndose al vector transmisor.

Según Burna, A 2017 (5). La técnica inmunohistoquímica mostró sensibilidad en la detección de amastigotes de *Leishmania* sp, resultando útil incluso cuando los parásitos estuvieron presentes en escasa cantidad.

De la misma forma Avalos, A. et al 2005 (9). Menciona que la inmunohistoquímica fue más eficaz a la hora de detectar la carga mínima parasitaria para confirmar la presencia de amastigotes de *Leishmania* sp similar a los antecedentes. El presente trabajo de investigación, también demostró sensibilidad en el método inmunohistoquímico, resultando útil en la detección de carga mínima parasitaria de *Leishmania* sp.

Según Fontes, C. 2013 (7). Utilizo suero hiperinmune de un can infectado por *Leishmania infantum* que se empleó como Ac primario seguido de la tecnología estreptavidina-biotina peroxidasa: facilito la tinción de alto contraste de amastigotes (marrón oscuro) contra el fondo azul claro. Similarmente, el presente trabajo de investigación para el método inmunohistoquímico, se utilizó suero humano hiperinmune infectado naturalmente con *Leishmania* sp facilitando la identificación parasitaria, mejorando así la sensibilidad y especificidad de la tecnología basado polímeros.

Así mismo Fonseca, L 2011 (8). Concluye que el método inmunohistoquímico en la detección de *Leishmania* sp, facilita la observación y evita confusiones en la identificación del parásito lo que mejora la calidad del diagnóstico.

Lo mismo, Fernández A. 2017 (6). Con su estudio “un nuevo escenario en el diagnóstico inmunohistoquímico de la leishmaniasis cutánea”, menciona que ciertos clones anti-CD1a, no manchan universalmente todas las especies de *Leishmanias* sp

del Nuevo Mundo. Y la presente investigación; según nuestros resultados: obtuvimos 2 casos de falsos negativos para el método inmunohistoquímico, para lo cual se puede concluir: que no todos los anticuerpos manchan o son específicos universalmente para todas las especies de *Leishmania* sp del Nuevo Mundo.

## CONCLUSIONES

- Se concluye, que el presente estudio demuestra la validez del método inmunohistoquímico revelando sensibilidad y especificidad, empleando como anticuerpo primario: suero humano hiperinmune infectado naturalmente con *Leishmania* sp con datos alentadores, frente a la tinción convencional hematoxilina-eosina y representando una herramienta alternativa para corroborar el diagnóstico parasitológico.
- La sensibilidad y especificidad por los resultados hallados en la presente investigación, ayudaron a clasificar los verdaderos positivos y verdaderos negativos.
- El método inmunohistoquímico respecto a su validación por su sensibilidad y especificidad con más del 90%, se puede emplear como un método alternativo estándar para la detección del parásito *Leishmania* sp en biopsias tegumentarias.
- Para el método inmunohistoquímico, el nivel de concordancia interobservador demuestra un índice de Kappa de 0.77 (concordancia buena). Bajo este contexto se concluye que por el método inmunohistoquímico se facilita la observación e identificación del parásito *Leishmania* sp, lo que mejora la calidad del diagnóstico y la reproducibilidad de la metodología.
- Para la tinción hematoxilina-eosina, el nivel de concordancia interobservador demuestra un índice de Kappa de 0.349 (concordancia baja). Bajo este contexto se concluye que por la tinción hematoxilina-eosina no tiene reproducibilidad diagnóstica interobservador.

## SUGERENCIAS

- Primero.-** A cada Servicio de Anatomía Patológica que cuente con el área de inmunohistoquímica, se sugiere la implementación del método inmunohistoquímico para *Leishmania* sp, creando o produciendo sus propios anticuerpos, ya que la mayoría de estos anticuerpos no están comercializados ni estandarizados para la detección del parásito *Leishmania* sp.
- Segundo.-** Para saber si el suero hiperinmune utilizado como anticuerpo primario es para diferentes especies de *Leishmania* sp, se sugiere la genotipificación parasitaria de las biopsias parafinadas mediante el método biomolecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).
- Tercero.-** Para que los resultados sean reproducibles y confiables. Es adecuado la estandarización de cada una de las fases (pre analítica, analítica y post analítica) a través de los resultados obtenidos mediante controles de calidad internos y externos, para así familiarizarse con anticuerpos adaptando a su técnica y su alcance
- Cuarto.-** Realizar una investigación a futuro en base a este trabajo de investigación, como método de corroboración diagnóstica para *Leishmania* sp.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vela JSA. Leishmaniasis-Ministerio De Salud. Revista Peruana de Medicina y Salud Pública. 2000;(8).
2. OMS. [Online].; 2018 [cited 2018 abril 24. Available from: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
3. PEREZ MB. Leishmaniasis Cutáneo-Andina en el Distrito de Quinocay, Provincia de Yauyos, Lima. Revistas de investigacion UNMSM. 2000; 61(2): p. 142-145.
4. Centro Nacional de Epidemiología PyCdEM. Casos de Leishmaniosis por años. In Casos de Leishmaniosis según departamentos Perú años. 2012-2016 y 2017; 2017. p. 1-9.
5. Burna AN, Catuogno MS, S.Negrette M, Montenegro MA. Estudio comparativo entre las técnicas convencionales e inmunohistoquímicas para el diagnóstico de leishmaniosis canina. Scielo. 2017 Julio; 8(2).
6. A. F. Un nuevo escenario en el diagnostico inmunohistoquimico de la leishmaniasis cutanea. Journal of cutaneous pathology. 2017 Diciembre;: p. 1051-1052.
7. al CAe. Leishmania tegumentaria americana: eficacia de un protocolo inmunohistoquimico para la deteccion de leishmania. PubMed. 2013 Mayo; 8(5).
8. Fonseca L"a. Deteccion por inmunohistoquimica de Leishmania infantum en hámster infectado experimentalmente. Scielo. 2011 Abril.
9. Avalos, A. Amarilla, S. P. Kegler, K. Wehrle, A. S. Maidana, L. G. Jimenez, T. Alonso, N. Gonzalez, E. G. "inmunomarcación de leishmania sp. en garrapatas y piel de caninos naturalmente infectados con leishmaniasis visceral canina". Revista científica. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNA. .
10. Palma G. Inmunopatología de la leishmaniasis tegumentaria americana (LATA). Dialnet. 2000; 5(1): p. 3-40.
11. Leonardo Sánchez-Saldaña ESAJPMyc. Leishmaniasis. Dermatologia peruana. 2005; 14(2).

12. zegarra jfz. estimación de volumen de lesiones producidas por leishmaniasis cutanea utilizando un escaner laser de triangulacion 3D. 2011..
13. Antioquia ud. Manual diagnostico y control de la leishmaniasis en centroamerica. 2010..
14. Caridad Socorro Castro ABQC. La inmunohistoquímica¿una herramienta milagrosa? 2018 diciembre..
15. Montuenga L. Tecnicas en histologia y biologia molecular. 2nd ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2014.
16. Buillier G. Biblioteca digital les iles oubliees. [Online]. Available from: [http://ibdigital.uib.es/greenstone/cgi-bin/library.cgi?e=d-10100-00---off-0medicinaBalear--00-2---0-10-0---0---0direct-10----4-----3-1l--10-ca-250---50-about---00-3-1-01-00--4--0--0-0-01-10-0utfZz-8-10&cl=CL3.3.33&d=Medicina\\_Balear\\_1993v08n3p119&x=1](http://ibdigital.uib.es/greenstone/cgi-bin/library.cgi?e=d-10100-00---off-0medicinaBalear--00-2---0-10-0---0---0direct-10----4-----3-1l--10-ca-250---50-about---00-3-1-01-00--4--0--0-0-01-10-0utfZz-8-10&cl=CL3.3.33&d=Medicina_Balear_1993v08n3p119&x=1).
17. AppliChem P. Google. [Online].; 2017 [cited 2018 Julio Jueves. Available from: [https://www.itwreagents.com/download\\_file/ce\\_ivd\\_instructions/CEIVD17/es/CEIVD17\\_es.pdf](https://www.itwreagents.com/download_file/ce_ivd_instructions/CEIVD17/es/CEIVD17_es.pdf).
18. Weedon D. Patologia piel. 2nd ed. Madrid-España: Marban libros, S.L; 2002.
19. PERU MDSD. LEISHMANIASIS. 2000..
20. E. S. Calidad y control de calidad en el laboratorio de procedimientos histológicos del departamento de patología. 1998; 59(2).
21. Mundial A. Principios y metodos de validacion de las pruebas de diagnostico de las enfermedades infecciosas. 2012.
22. Moral rgd. Laboratorio en anatomia patologica. 1st ed. Madrid: s.a mc graw-hill intraamericana de españa; 1993.

# **ANEXOS**

**ANEXO 1**  
**INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS LLENADOS POR EL**  
**INVESTIGADOR**

**Código:**

**Edad:** \_\_\_\_\_

**Sexo:**            **a)** Masculino ( )            **b)** Femenino ( )

**Lugar de lesión:**    Cutánea:             Mucocutánea:

**Procedencia (probable lugar de contagio):**

**a)** Cusco ( )    **b)** Madre de Dios ( )    **c)** Otros ( )

**Antecedente de tratamiento para Leishmania:**    SI             NO

**Enfermedad diagnosticada:** Leishmaniasis     Otras patologías

## ANEXO 2

### FICHA DE RESULTADOS- METODO INMUNOHISTOQUIMICO

Indicar si el resultado es "positivo" o "negativo" a la presencia de amastigotes de  
Leishmania sp.

CODIGO	RESULTADO DE LECTURA	CODIGO	RESULTADO DE LECTURA
BX-01-18		BX-28-18	
BX-02-18		BX-29-18	
BX-03-18		BX-30-18	
BX-04-18		BX-31-18	
BX-05-18		BX-32-18	
BX-06-18		BX-33-18	
BX-07-18		BX-34-18	
BX-08-18		BX-35-18	
BX-09-18		BX-36-18	
BX-10-18		BX-37-18	
BX-11-18		BX-38-18	
BX-12-18		BX-39-18	
BX-13-18		BX-40-18	
BX-14-18		BX-41-18	
BX-15-18		BX-42-18	
BX-16-18		BX-43-18	
BX-17-18		BX-44-18	
BX-18-18		BX-45-18	
BX-19-18		BX-46-18	
BX-20-18		BX-47-18	
BX-21-18		BX-48-18	
BX-22-18		BX-49-18	
BX-23-18		BX-50-18	
BX-24-18		BX-51-18	
BX-25-18		BX-52-18	
BX-26-18		BX-53-18	
BX-27-18			

Firma y sello del responsable de lectura

Fecha:

### ANEXO 3

#### FICHA DE RESULTADOS- HEMATOXILINA-EOSINA

Indicar si el resultado es "positivo" o "negativo" a la presencia de amastigotes de Leishmania sp.

CODIGO	RESULTADO DE LECTURA	CODIGO	RESULTADO DE LECTURA
BX-01-18		BX-28-18	
BX-02-18		BX-29-18	
BX-03-18		BX-30-18	
BX-04-18		BX-31-18	
BX-05-18		BX-32-18	
BX-06-18		BX-33-18	
BX-07-18		BX-34-18	
BX-08-18		BX-35-18	
BX-09-18		BX-36-18	
BX-10-18		BX-37-18	
BX-11-18		BX-38-18	
BX-12-18		BX-39-18	
BX-13-18		BX-40-18	
BX-14-18		BX-41-18	
BX-15-18		BX-42-18	
BX-16-18		BX-43-18	
BX-17-18		BX-44-18	
BX-18-18		BX-45-18	
BX-19-18		BX-46-18	
BX-20-18		BX-47-18	
BX-21-18		BX-48-18	
BX-22-18		BX-49-18	
BX-23-18		BX-50-18	
BX-24-18		BX-51-18	
BX-25-18		BX-52-18	
BX-26-18		BX-53-18	
BX-27-18			

Firma y sello del responsable de lectura

Fecha:

## ANEXO 4

### FORMULARIO DE INFORMACION PARA EL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION

**TITULO: “VALIDACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUIMICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIA SP. EN BIOPSIAS CUTÁNEAS Y MUCOCUTANEAS EN EL HOSPITAL REGIONAL CUSCO-ENERO A JUNIO DEL 2018”.**

Investigador: Bach. Tecnología médica, Jharol Cristian Fuentes Borda

---

Le invito a participar en el proyecto de investigación para la detección del parasito de Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas. En este documento encontrara palabras que no podrá entender, para tal caso pida que se le explique cualquier palabra y/o procedimiento que no comprenda con claridad. En caso no pueda leer mi persona se lo leerá por usted, y si usted desea puede tener un testigo o decirle a alguna persona de su confianza que lea durante el acto de consentimiento informado.

**Procedimiento:**

Antes de entrar a este estudio se le evaluara para determinar si reúne las condiciones necesarias para su ingreso en este proyecto de investigación. Se le hará una revisión de sus antecedentes de infecciones, tratamientos previos y medicamentos que está tomando.

Para ello, si usted acepta voluntariamente, se le tomara la siguiente muestra.

**Extracción de sangre:** se le tomara una muestra de sangre de 2 tubos de 12 ml (2 cucharadas y media) a partir del cual se le extraerá el suero.

Separado el suero, se alicuotará en distintos crio viales para ser almacenado a -30 grados para su posterior dilución y aplicación del proyecto. Esta muestra podría permitir en el futuro evaluar su respuesta inmune, lo que contribuirá con el desarrollo de una prueba que podrá mejorar el diagnóstico confirmatorio de leishmaniasis.

El riesgo en la extracción de sangre, serán molestias mínimas de un pinchazo para la extracción de sangre, que se intentaran evitar al máximo, considerando las condiciones asépticas adecuadas. Además existe el riesgo de un pequeño hematoma el cual desaparecerá en aproximadamente 5 días.

**Costos e incentivos:**

Usted no deberá pagar por nada por participar en este estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole, únicamente tendrá la satisfacción de colaborar en un estudio que podría ayudar a elaborar un nuevo método diagnóstico para la leishmaniasis, ayudando a las demás personas que la padecen.

**Confidencialidad:**

Guardare su información con código (número o letra) y no con nombres, si se mostrase publicación de este estudio, no se mostrara ninguna información que permita su identificación sin su consentimiento.

**CONSENTIMIENTO:**

Mediante el presente declaro que he leído el presente documento y realice las preguntas necesarias y acepto voluntariamente participar en este estudio.

\_\_\_\_\_  
Firma participante

Nombre:.....

DNI: .....

Huella digital (en caso no sepa leer)

Hora

y

fecha:

.....

Testigo imparcial: en caso que el paciente no sepa leer ni escribir

\_\_\_\_\_  
Firma testigo

Nombre:.....

DNI: .....

## ANEXO 5

### FICHA DE INSTRUMENTOS DE DATOS Y RESULTADOS LLENADOS POR EL INVESTIGADOR

Código	Edad	Sexo		Lugar de lesión		Procedencia o lugar de contagio			Antecedente de tratamiento para		Enfermedad diagnosticada		Diagnóstico inmunohistoquímico o obs. "A"	Diagnóstico Hematoxilina -Eosina Obs. "A"	Diagnóstico inmunohistoquímico o obs. "B"	Diagnóstico Hematoxilina -Eosina obs. "B"
		Mas	Fem.	Cutanea	Mucocutane	Cusco	Madre de Dios	Otros	Si	No	Leishmaniasis	Otras patologí				
BX-01-18	33	M			X		X		X		X		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-02-18	34	M		X			X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-03-18	25	M		X		X			X			X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-04-18	47	M			X		X		X		X		Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
BX-05-18	41	M			X		X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-06-18	48	M		X		X			X		X		Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-07-18	37	M			X		X		X		X		Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-08-18	41	M			X	X			X			X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-09-18	33	F	X			X			X		X		Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-10-18	20	M		X			X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-11-18	36		F	X					X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-12-18	42	M		X			X		X			X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-13-18	25	M		X			X		X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-14-18	87	M			X		X		X		X		Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
BX-15-18	52	M		X		X			X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-16-18	31	M		X			X		X		X		Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
BX-17-18	45	M			X		X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
BX-18-18	34	M		X					X	X			Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-19-18	29	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-20-18	33	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-21-18	41	M			X		X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-22-18	30	M		X			X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-23-18	61	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-24-18	31	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-25-18	54	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-26-18	48	M			X		X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-27-18	37	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Código	Edad	Sexo		Lugar de lesión		Procedencia o lugar de contagio			Antecedente de tratamiento		Enfermedad diagnosticada		Diagnóstico inmunohistoquímico o obs. "A"	Diagnóstico Hematoxilina -Eosina Obs. "A"	Diagnóstico inmunohistoquímico o obs. "B"	Diagnóstico Hematoxilina -Eosina obs. "B"
		Mas	Fem.	Cutanea	Mucocutane	Cusco	Madre de Dios	Otros	Si	No	Leishmaniasis	Otras patologí				
BX-28-18	59	M			X		X		X		X		Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-29-18	22	M		X			X		X		X		Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-30-18	35	M		X			X		X		X		Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
BX-31-18	54	M			X		X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-32-18	48	M		X					X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-33-18	26	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-34-18	41	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-35-18	23	M		X			X			X		X	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-36-18	28	M			X		X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-37-18	42	M			X		X		X				Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-38-18	56	M		X			X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-39-18	13	M		X			X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-40-18	53	M		X			X			X		X	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-41-18	46	M		X			X		X		X		Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-42-18	46	M		X			X		X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
BX-43-18	46	M		X			X		X		X		Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-44-18	46	M		X			X		X		X		Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
BX-45-18	18	M		X			X		X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-46-18	42	M		X			X		X		X		Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
BX-47-18	64	M			X		X		X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-48-18	44	M		X			X		X		X		Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-49-18	64	M			X		X		X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-50-18	57	M			X		X		X		X		Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
BX-51-18	29	M		X			X		X		X		Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-52-18	49	M			X		X		X		X		Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
BX-53-18	52	M		X			X		X		X		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo

## ANEXO 6

### FICHA DE INSTRUMENTOS DE RESULTADO LLENADO POR EL EXPERTO

#### FICHA DE INSTRUMENTO PARA SER LLENADO POR EL MEDICO ANATOMO PATOLOGO

#### METODO INMUNOHISTOQUIMICA

Indicar si el resultado es "positivo" o "negativo" a la presencia de amastigotes de Leishmania sp.

CODIGO	RESULTADO DE LECTURA	CODIGO	RESULTADO DE LECTURA
BX-01-18	positivo	BX-28-18	positivo
BX-02-18	positivo	BX-29-18	positivo
BX-03-18	negativo	BX-30-18	negativo
BX-04-18	negativo	BX-31-18	positivo
BX-05-18	positivo	BX-32-18	negativo
BX-06-18	negativo	BX-33-18	negativo
BX-07-18	positivo	BX-34-18	negativo
BX-08-18	negativo	BX-35-18	positivo
BX-09-18	positivo	BX-36-18	positivo
BX-10-18	positivo	BX-37-18	positivo
BX-11-18	negativo	BX-38-18	positivo
BX-12-18	negativo	BX-39-18	positivo
BX-13-18	negativo	BX-40-18	negativo
BX-14-18	negativo	BX-41-18	positivo
BX-15-18	negativo	BX-42-18	negativo
BX-16-18	positivo	BX-43-18	positivo
BX-17-18	positivo	BX-44-18	positivo
BX-18-18	negativo	BX-45-18	negativo
BX-19-18	negativo	BX-46-18	positivo
BX-20-18	negativo	BX-47-18	negativo
BX-21-18	positivo	BX-48-18	positivo
BX-22-18	positivo	BX-49-18	negativo
BX-23-18	negativo	BX-50-18	negativo
BX-24-18	negativo	BX-51-18	positivo
BX-25-18	negativo	BX-52-18	positivo
BX-26-18	positivo	BX-53-18	negativo
BX-27-18	negativo		

Firma y sello del responsable de lectura

Fecha:

17 NOV. 2018

  
Dra. Violeta Arsuqui Carrasco  
MEDICO ANATOMOPATOLOGO  
CMP. 39911 RNE. 16804

## ANEXO 7

### FICHA DE INSTRUMENTOS DE RESULTADO LLENADO POR EL EXPERTO

FICHA DE INSTRUMENTO PARA SER LLENADO POR EL MEDICO ANATOMO PATOLOGO

METODO HEMATOXILINA-EJSINA

Indicar si el resultado es "positivo" o "negativo" a la presencia de amastigotes de Leishmania sp.

CODIGO	RESULTADO DE LECTURA	CODIGO	RESULTADO DE LECTURA
BX-01-18	negativo	BX-28-18	negativo
BX-02-18	positivo	BX-29-18	negativo
BX-03-18	negativo	BX-30-18	positivo
BX-04-18	positivo	BX-31-18	positivo
BX-05-18	positivo	BX-32-18	negativo
BX-06-18	positivo	BX-33-18	negativo
BX-07-18	negativo	BX-34-18	negativo
BX-08-18	negativo	BX-35-18	positivo
BX-09-18	negativo	BX-36-18	positivo
BX-10-18	positivo	BX-37-18	negativo
BX-11-18	negativo	BX-38-18	positivo
BX-12-18	negativo	BX-39-18	positivo
BX-13-18	negativo	BX-40-18	negativo
BX-14-18	positivo	BX-41-18	negativo
BX-15-18	negativo	BX-42-18	negativo
BX-16-18	positivo	BX-43-18	negativo
BX-17-18	positivo	BX-44-18	positivo
BX-18-18	negativo	BX-45-18	negativo
BX-19-18	negativo	BX-46-18	positivo
BX-20-18	negativo	BX-47-18	negativo
BX-21-18	positivo	BX-48-18	negativo
BX-22-18	positivo	BX-49-18	negativo
BX-23-18	negativo	BX-50-18	negativo
BX-24-18	negativo	BX-51-18	negativo
BX-25-18	negativo	BX-52-18	negativo
BX-26-18	positivo	BX-53-18	positivo
BX-27-18	negativo		

Firma y sello del responsable de lectura

Fecha:

17 NOV. 2018

  
  
Dra. Violeta Aragon Carrasco  
MEDICO ANATOMOPATOLOGO  
C.M.P. 7441

## ANEXO 8

### FICHA DE INSTRUMENTOS DE RESULTADO LLENADO POR EL EXPERTO

#### FICHA DE INSTRUMENTO PARA SER LLENADO POR EL MEDICO ANATOMO PATOLOGO

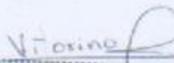
##### METODO INMUNOHISTOQUIMICA

Indicar si el resultado es "positivo" o "negativo" a la presencia de amastigotes de Leishmania sp.

CODIGO	RESULTADO DE LECTURA	CODIGO	RESULTADO DE LECTURA
BX-01-18	Negativo	BX-28-18	Positivo
BX-02-18	Positivo	BX-29-18	Positivo
BX-03-18	Negativo	BX-30-18	Negativo
BX-04-18	Negativo	BX-31-18	Positivo
BX-05-18	Positivo	BX-32-18	Negativo
BX-06-18	Positivo	BX-33-18	Negativo
BX-07-18	Negativo	BX-34-18	Negativo
BX-08-18	Negativo	BX-35-18	Positivo
BX-09-18	Positivo	BX-36-18	Positivo
BX-10-18	Positivo	BX-37-18	Positivo
BX-11-18	Negativo	BX-38-18	Positivo
BX-12-18	Negativo	BX-39-18	Positivo
BX-13-18	Negativo	BX-40-18	Negativo
BX-14-18	Negativo	BX-41-18	Positivo
BX-15-18	Negativo	BX-42-18	Negativo
BX-16-18	Negativo	BX-43-18	Positivo
BX-17-18	Positivo	BX-44-18	Positivo
BX-18-18	Negativo	BX-45-18	Negativo
BX-19-18	Negativo	BX-46-18	Negativo
BX-20-18	Negativo	BX-47-18	Negativo
BX-21-18	Positivo	BX-48-18	Positivo
BX-22-18	Positivo	BX-49-18	Negativo
BX-23-18	Negativo	BX-50-18	Negativo
BX-24-18	Negativo	BX-51-18	Positivo
BX-25-18	Positivo	BX-52-18	Positivo
BX-26-18	Positivo	BX-53-18	Negativo
BX-27-18	Negativo		

Firma y sello del responsable de lectura

Fecha: 26/11/18

  
MABEL AUCCA VITTORINO  
CMP. 50361 - RNE. 26665

## ANEXO 9

### FICHA DE INSTRUMENTOS DE RESULTADO LLENADO POR EL EXPERTO

FICHA DE INSTRUMENTO PARA SER LLENADO POR EL MEDICO ANATOMO PATOLOGO

METODO HEMATOXILINA-EOSINA

Indicar si el resultado es "positivo" o "negativo" a la presencia de amastigotes de Leishmania sp.

CODIGO	RESULTADO DE LECTURA	CODIGO	RESULTADO DE LECTURA
BX-01-18	Negativo	BX-28-18	Positivo
BX-02-18	Positivo	BX-29-18	Positivo
BX-03-18	Negativo	BX-30-18	Negativo
BX-04-18	Negativo	BX-31-18	Positivo
BX-05-18	Positivo	BX-32-18	Negativo
BX-06-18	Positivo	BX-33-18	Negativo
BX-07-18	Negativo	BX-34-18	Negativo
BX-08-18	Negativo	BX-35-18	Positivo
BX-09-18	Positivo	BX-36-18	Positivo
BX-10-18	Positivo	BX-37-18	Positivo
BX-11-18	Negativo	BX-38-18	Positivo
BX-12-18	Negativo	BX-39-18	Positivo
BX-13-18	Negativo	BX-40-18	Negativo
BX-14-18	Negativo	BX-41-18	Positivo
BX-15-18	Negativo	BX-42-18	Positivo
BX-16-18	Negativo	BX-43-18	Positivo
BX-17-18	Negativo	BX-44-18	Positivo
BX-18-18	Negativo	BX-45-18	Negativo
BX-19-18	Negativo	BX-46-18	Negativo
BX-20-18	Negativo	BX-47-18	Negativo
BX-21-18	Positivo	BX-48-18	Positivo
BX-22-18	Positivo	BX-49-18	Negativo
BX-23-18	Negativo	BX-50-18	Negativo
BX-24-18	Negativo	BX-51-18	Positivo
BX-25-18	Positivo	BX-52-18	Positivo
BX-26-18	Positivo	BX-53-18	Positivo
BX-27-18	Negativo		

Firma y sello del responsable de lectura

Fecha:

26/11/18

  
MABEL AUCCA VITORINO  
C.O.P. RNE 2665

## ANEXO 10

### PRUEBA DE IFI DE PACIENTE CON LEISHMANIA SP.



#### INFORME DE RESULTADO

PACIENTE :   
ESTABLECIMIENTO : HOSPITAL REGIONAL  
CODIGO DE REFERENCIA : 023031800432  
ENFERMEDAD : LEISHMANIASIS      FECHA DE OBT. DE MUESTRA : 23/01/2018  
TIPO DE MUESTRA : SUERO      FECHA DE RECEP. LAB. REF.: 25/01/2018  
CODIGO DE MUESTRA :      FECHA EMISION DE RESULTADO:31/01/2018

#### PRUEBAS

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA : POSITIVO  
DILS : 1/320  
FECHA DE ANALISIS : 26/01/2018

**INTERPRETACION:** Título de valor diagnóstico de la prueba IFI: 1/40.  
**Positivo:** Detección de anticuerpos (IgG) anti-Leishmania.  
**Negativo:** No se detecta la presencia de anticuerpos (IgG) anti-Leishmania.  
**Indeterminado:** Anticuerpos (IgG) anti-Leishmania débilmente detectables.

#### OBSERVACION:

Responsable Analista: Tec. Lab María Luisa Arizábal Pillco



DIRECTOR DEL LABORATORIO  
BLGO. CARLA OSORIO RAMOS  
CBP: 6102

## ANEXO 11

### DOCUMENTO DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS



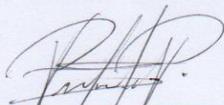
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA-LABORATORIO CLINICO Y  
ANATOMIA PATOLOGICA

#### VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS

Solicito de su opinión sobre los instrumentos que se pretende aplicar para ser utilizado para mi trabajo de investigación denominado “**VALIDACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUIMICA COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA LEISHMANIA sp. EN BIOPSIAS CUTÁNEAS Y MUCOCUTÁNEAS EN EL HOSPITAL REGIONAL CUSCO- ENERO A JUNIO DEL 2018**”, la misma que requiere validación del instrumento de la presente investigación.

Agradeciéndole por anticipado su gentil colaboración como experto, me suscribo a usted.

Atentamente



Jharol Cristian Fuentes Borda  
Bachiller en Tecnología Médica

INDICACION: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems de cuestionario que se le presenta, marque con un aspa el casillero que cree conveniente de acuerdo a su criterio y experiencia profesional, denotando si cuenta o no cuenta con los requisitos mínimos de formulación para su posterior aplicación.

#### VALORACIÓN LUEGO DE REVISADO EL INSTRUMENTO

Procede su ejecución

Debe corregirse

Procede su ejecución

Debe corregirse



  
Dra. Violeta Alagon Carrasco  
MEDICO ANATOMOPATOLOGO  
CMP. 39911 RNE. 18804

  
GOBIERNO REGIONAL CUSCO  
DIRECCION REGIONAL DE SALUD CUSCO  
HOSPITAL REGIONAL DEL CUSCO  
Lic. T.M. Ricardo Alvaro Santos Saicedo  
Tecnólogo Médicos Laboratorio Clínico EPIC en TS-4480DA y 4480DB  
C.T.M.R. 6797

## ANEXO 12

## DOCUMENTO DE AUTORIZACIÓN PARA LA EJECUCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN-HOSPITAL REGIONAL CUSCO

	<b>Gobierno Regional CUSCO</b> <b>DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD CUSCO</b> <b>HOSPITAL REGIONAL DEL CUSCO</b>	
<i>"AÑO DEL DIALOGO Y LA RECONCILIACION NACIONAL"</i> <i>"Cusco, Capital Arqueológica de América"</i>		
Cusco, <b>17 NOV 2018</b>		
DRSC.PROV.Nº. <u>106 -2018-HRC.DE</u>		
DE	:	Director Ejecutivo del Hospital Regional Cusco
A	:	Señor Jharol Cristian Fuentes Borda
ASUNTO	:	Autorización de Aplicación de Trabajo de Investigación
REF.	:	Exp. 11882 - 18
<p>Visto el documento que antecede, de acuerdo a la opinión favorable del Comité de Investigación, Jefatura del Servicio de Anatomía Patológica y la Unidad de Capacitación, la Dirección Ejecutiva del Hospital Regional del Cusco, autoriza la realización de la aplicación del Instrumento de trabajo de Investigación, intitulado "Validación de la Inmunohistoquímica como Método Diagnóstico para Leishmania sp. En Biopsias Cutáneas y Mucocutáneas en el Hospital Regional del Cusco - Enero a Junio del 2018". Debiendo acogerse al horario y normas de la Institución.</p> <p>Atentamente,</p>		
  <p>GOBIERNO REGIONAL CUSCO DIRECCIÓN REGIONAL DE SALUD CUSCO HOSPITAL REGIONAL DEL CUSCO</p> <p>Med. Víctor A. Béjar Bravo DIRECTOR EJECUTIVO C.M.P. 16783</p>		
c.c. Archivo VBB/try		
Av. La Cultura s/n Telf.: 227661 – 231131 Emergencia Telf.: 223691 CUSCO - PERU <a href="http://www.hospitalregionalcusco.gob.pe">www.hospitalregionalcusco.gob.pe</a> <a href="mailto:hrc@hospitalregionalcusco.gob.pe">hrc@hospitalregionalcusco.gob.pe</a> Hospital Regional Cusco / Hospital Reg Cusco		

### ANEXO 13

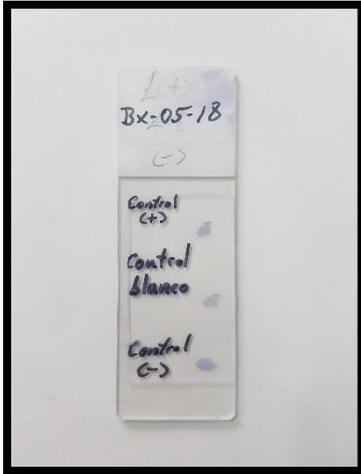
### PROCEDIMIENTO DE INMUNOHISTOQUIMICA

1. Corte o sección de tejido en parafina (3 a 5 micras) en láminas silanizadas.
2. Colocar las láminas en una canastilla y llevar a la estufa a 70°C por 20 minutos como mínimo.
3. Sumergir la canastilla 1 sola vez en ottix Plus (sustituto de xileno) y colocar nuevamente a la estufa por 5 minutos.
4. sumergir la canastilla en el ottix plus (dos pasos) por 5 minutos, y luego pasar a ottix shapper por 5 minutos (1 solo paso). Lavar con agua destilada para su hidratación.
5. Colocar la canastilla en un recipiente con solución recuperadora de Ag y llevar al baño a 89°C por 25 minutos, luego retirar la canastilla y dejar enfriar a temperatura ambiente 15 minutos.
6. Retirar las láminas de la canastilla una por una e ir lavando con solución buffer 1 X utilizando una pizeta para luego colocar en una cámara húmeda.
7. Lamina por lámina marcar a rededor del tejido con plumón hidrofóbico.
8. Colocar 1 gota de peróxido de hidrogeno sobre cada tejido por 5 minutos.
9. Lavar con solución buffer y nuevamente agregar con un gotero solución buffer sobre cada tejido y dejar reposar por 3 minutos.
10. Sacudir cada lamina para sacar el exceso de buffer y agregar 50 micro litros de anticuerpo primario por 25 minutos.
11. Incubar a 37°C. por 30 minutos.
12. Lavar con solución buffer y nuevamente agregar con un gotero solución buffer sobre cada tejido y dejar reposar por 3 minutos.
13. Agregar 50 micro litros del anticuerpo secundario por 15 minutos.
14. Lavar con solución buffer y nuevamente agregar con un gotero solución buffer sobre cada tejido y dejar reposar por 3 minutos.
15. Agregar 50 micro litros de polímero por 20 minutos.
16. Lavar con solución buffer y volver a lavar con agua destilada.
17. Preparar la solución sustrato-cromógeno (1ml de sustrato con una gota de DAB).
18. Agregar 50 microlitros de la solución sustrato-cromógeno sobre cada tejido y dejar actuar por 5 minutos. Luego coger cada lamina de la cámara húmeda a la canastilla para lavar con agua destilada.
19. Contrastar con hematoxilina 2 a 3 sumergidas.

20. Lavar con agua destilada
21. Sumergir al agua amoniacal de 2 a 3 sumergidas y luego lavar con agua destilada.
22. Deshidratamos en 2 cubetas con solución ottix shapper por 30 segundos en cada cubeta y luego colocamos en 2 cubetas con solución ottix plus por 2 minutos en cada una de ellas.
23. Por ultimo realizamos el montaje con cubre objetos sobre cada lamina y llevar al microscopio para su lectura.

## ANEXO 14

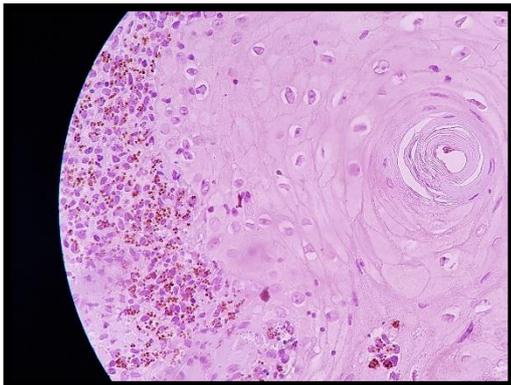
### IMAGENES



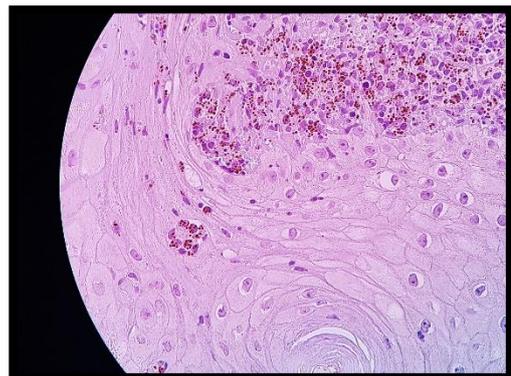
Código BX-05-19. Lamina de control de calidad por IHQ.



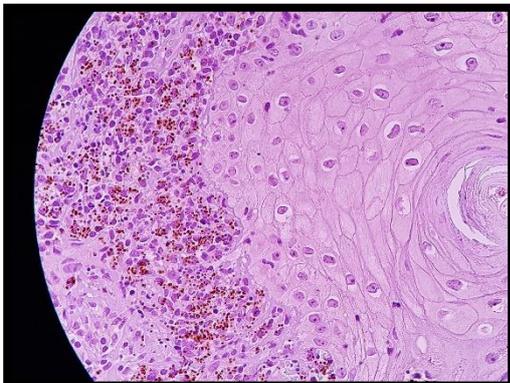
Código BX-05-19. Lamina de IHQ. Dilución de Ac primario en: 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320.



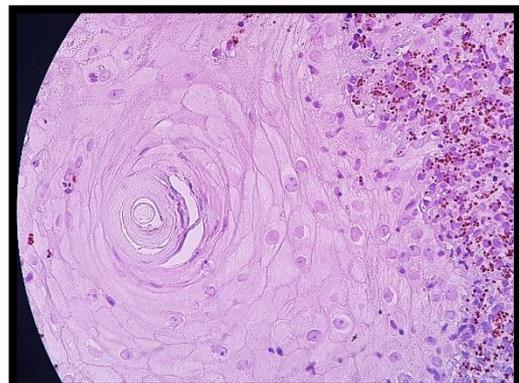
Código BX-05-19. IHQ. Amastigotes de Leishmania sp con dilución de Ac primario en 1/40.



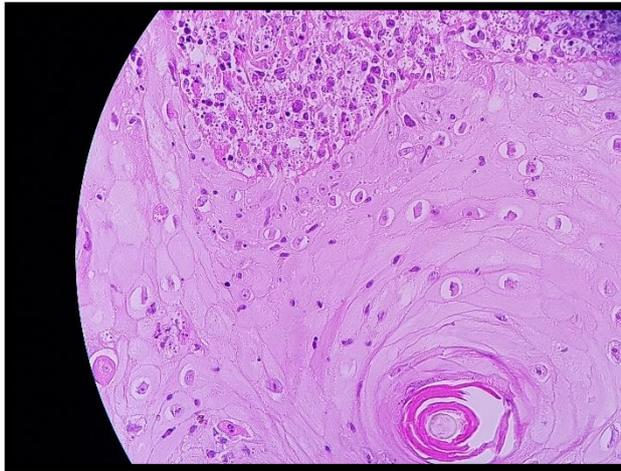
Código BX-05-19. IHQ. Amastigotes de Leishmania sp con dilución de Ac primario en 1/80.



Código BX-05-19. IHQ. Amastigotes de Leishmania sp con dilución de Ac primario en 1/160.



Código BX-05-19. IHQ. Amastigotes de Leishmania sp con dilución de Ac primario en 1/320.



Código BX-05-19. Hematoxilina-Eosina. Amastigotes de Leishmania sp.

## ANEXO 15

### EQUIPOS Y KIT DE REACTIVOS UTILIZADOS DURANTE LA INVESTIGACIÓN EN EL MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO.



**Micrótopo**



**Flotador de tejidos o Baño  
María**



**Plancha desparafinadora**



**Baño María**



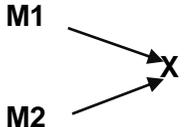
**Incubadora**



**Kit de reactivos para IHQ  
(NOVOCASTRA-Leica)**

## MATRIZ DE CONSISTENCIA

### “VALIDACION DE LA INMUNOHISTOQUIMICA COMO METODO DIAGNOSTICO PARA LEISHMANIA sp. EN BIOPSIAS CUTÁNEAS Y MUCOCUTÁNEAS EN EL HOSPITAL REGIONAL CUSCO - ENERO A JUNIO DEL 2018”

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVOS GENERALES	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>¿Cómo validar la aplicación de la inmunohistoquímica como método diagnóstico para Leishmania sp. en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?</p>	<p>Validar la Inmunohistoquímica como método diagnóstico para Leishmania sp. en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018.</p>	<p>La inmunohistoquímica tiene validez diagnóstica para Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional cusco – enero a junio del 2018.</p>	<p><b>Variable independiente 1</b> Método de diagnóstico a través de la inmunohistoquímica.</p> <p><b>Variable independiente 2</b> Método de diagnóstico tinción Hematoxilina-Eosina.</p> <p><b>Variable dependiente</b></p>	<p><b>Tipo:</b> Comparativo. <b>Nivel:</b> Descriptivo Explicativo y Cualitativo. <b>Diseño:</b> No experimental. <b>Método:</b> Inductivo <b>Diseño esquemático de la investigación:</b> Transversal. <b>Esquema:</b></p> <div style="text-align: right;">  <pre> graph LR     M1 --&gt; X     M2 --&gt; X             </pre> </div>

			<p>Detección de Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas.</p>	<p><b>Población:</b> Según el registro de solicitudes de estudio anatómico patológico de biopsias cutáneas y mucocutáneas para descartar de leishmaniasis de enero a junio del año 2018, suman un total de 53 casos.</p> <p><b>Muestra:</b> Se considerará una muestra no probabilística de tipo censal por conveniencia.</p>
<p><b>PROBLEMAS ESPECÍFICOS</b></p>	<p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b></p>		<p><b>VARIABLES INTERVINIENTES</b></p>	
<p>¿Cuál es la sensibilidad de la aplicación de la Inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, para el diagnóstico del parásito Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?</p>	<p>Establecer la sensibilidad de la aplicación de la Inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, para el diagnóstico del parásito Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018.</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad.</li> <li>• Sexo.</li> <li>• Probable lugar de infección.</li> <li>• Tipo de lesión (cutánea y mucocutánea).</li> <li>• Antecedente de tratamiento.</li> </ul>	

<p>¿Cuál es la especificidad de la aplicación de la Inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, para el diagnóstico del parásito Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?</p>	<p>Establecer la especificidad de la aplicación de la Inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, para el diagnóstico del parásito Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018.</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad diagnosticada.</li> </ul>	
<p>¿Cuál es el nivel de concordancia de resultados interobservador con la aplicación de la inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina, para</p>	<p>Establecer el nivel de concordancia de resultados interobservador con la aplicación de la inmunohistoquímica en relación a la tinción convencional Hematoxilina-Eosina,</p>			

<p>el diagnóstico del parasito Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?</p>	<p>para el diagnóstico del parasito Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco – Enero a Junio del 2018?</p>			
---	--	--	--	--