



ESTADO PLURINACIONAL DE
BOLIVIA

MINISTERIO DE
SALUD Y DEPORTES

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS OPERATIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS LEISHMANIASIS

PUBLICACIÓN
557

Serie: Documentos Técnico Normativos

La Paz - Bolivia
2025



ESTADO PLURINACIONAL DE
BOLIVIA

MINISTERIO DE
SALUD Y DEPORTES

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS OPERATIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS LEISHMANIASIS



Serie: Documentos Técnico Normativos

**La Paz - Bolivia
2025**

R-BO
WC715
M665m
No. 557
2025

Bolivia. Ministerio de Salud y Deportes. Dirección General de Epidemiología. Unidad de Prevención y Control de Enfermedades. Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores.
Manual de procedimientos técnicos operativos para el diagnóstico de laboratorio de las Leishmaniasis. 2. ed. /Ministerio de Salud y Deportes; Ana María Callisaya Ramos; René Rolando Terrazas Ortiz; Omar Flores Velasco. Coaut. La Paz : Artgraf Paz, 2025.

109p.: ilus. (Serie: Documentos Técnico Normativos No. 557)

Depósito legal: 4-1-205-2025 P.O.

- I. LEISHMANIASIS^sprevención & control
- II. LEISHMANIASIS^sdiagnóstico
- III. LEISHMANIASIS CUTÁNEA^sdiagnóstico
- IV. LEISHMANIASIS VISCERAL^sdiagnóstico
- V. POLÍTICAS, PLANIFICACIÓN Y ADMINISTRACIÓN EN SALUD
- VI. TÉCNICAS DE LABORATORIO CLÍNICO^snormas
- VII. SERVICIOS DE SALUD^sprovisión & distribución
- VIII. SALUD PÚBLICA
- IX. MANUALES DE REFERENCIA
- X. BOLIVIA
1. t.
2. Serie
3. Callisaya Ramos, Ana María; Terrazas Ortiz, René Rolando; Flores Velasco, Omar. Coaut.

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS OPERATIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS LEISHMANIASIS

Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores, dependiente de la Dirección General de Epidemiología, Edificio Víctor P.4, calle Fernando Guachalla N°342 entre 20 de octubre y 6 de agosto. Telefono/Fax N° 591-2-2124766. <https://www.minsalud.gob.bo/>

R.M.: N° 0197 de 28 de mayo de 2025

Depósito legal: 4 - 1 - 205 - 2025 P.O.

Elaboración:

Dr. R. Rolando Terrazas Ortiz - Profesional PNETV Componente Leishmaniasis

Dr. Omar Flores Velasco - Profesional PNETV Componente Leishmaniasis

Dra. Ana María Callisaya Ramos - Consultora OPS/OMS

Diseño y Diagramación: Unidad de Comunicación

Revisión:

Dra. Roxana Elizabeth E. Salamanca Kacic - Jefa de la Unidad de Prevención y Control de Enfermedades - MSyD.

Dr. Néstor Freddy Armijo Subieta - Director General de Epidemiología - MSyD.

Revisión final:

Dra. Evelin Esther Fortún Fernández - Directora General Ejecutiva del INLASA - MSyD.

Dra. Fabiola Ximena Montesinos Rodríguez - Coordinadora Nacional de Laboratorios (CONALAB) - MSyD.

Validación del documento (Anexo editorial)

Comité Técnico de Revisión de Publicaciones CTRP/DGPPS

Comité de identidad Institucional y Publicaciones CIIP/VGSNS

- Dra. Mariana Camila Ramírez López
- Dra. Sdenka Maury Fernández
- Dra. Claudia Reas Mayta
- Tec. Rodrigo Omar Chipana Cortez
- Dr. Juan Marcos Rodríguez Morales
- Dr. Reynaldo Aguilar Alvarez
- Dra. Tania Huanca Uluri
- Tec. Marcelo Martínez Quisbert

La Paz, Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores - Unidad de Prevención y Control de Enfermedades - Dirección General de Epidemiología - Comité de Identidad Institucional y Publicaciones - Viceministerio de Promoción, Vigilancia Epidemiológica y Medicina Tradicional - Ministerio de Salud y Deportes - 2025.

© Ministerio de Salud y Deportes 2025

Esta publicación es propiedad del Ministerio de Salud y Deportes del Estado Plurinacional de Bolivia, se autoriza su reproducción, total o parcial, siempre que no sea con fines de lucro, a condición de citar la fuente y la propiedad.

Segunda Edición

Impreso en Bolivia

**MINISTERIO DE SALUD
Y DEPORTES**

AUTORIDADES NACIONALES

Maria Renée Castro Cusicanqui
MINISTRA DE SALUD y DEPORTES

Dr. Max Francisco Enríquez Nava
**VICEMINISTRO DE PROMOCIÓN, VIGILANCIA
EPIDEMIOLÓGICA Y MEDICINA TRADICIONAL**

Dra. Mariana Camila Ramirez López
**VICEMINISTRA DE GESTIÓN
DEL SISTEMA NACIONAL DE SALUD a.i.**

Soraya Karen Palenque Gutierrez
VICEMINISTRA DE DEPORTES a.i.

Dr. Néstor Freddy Armijo Subieta
DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA


PRESENTACIÓN

El Ministerio de Salud y Deportes reafirma su compromiso con la erradicación de toda forma de exclusión, discriminación y marginación, garantizando el ejercicio pleno de los derechos sociales, políticos, culturales y económicos de las personas, las familias y la comunidad. Con esta visión integral, se elaboró el Plan Sectorial de Desarrollo Integral para Vivir Bien - Sector Salud 2021-2025, un instrumento de gestión y planificación que orienta la transformación del sistema de salud, la reorientación de los servicios y la atención de las prioridades sanitarias nacionales en este quinquenio del Bicentenario.

En el marco del Plan Estratégico Institucional 2021-2025, se establecen lineamientos estratégicos para la reducción de enfermedades transmisibles y no transmisibles, en concordancia con la política nacional de la Salud Familiar Comunitaria Intercultural (SAFCI), que prioriza la promoción de la salud y la prevención de enfermedades en todas las redes y establecimientos de salud del país.

Como parte de estos esfuerzos, el Estado Plurinacional de Bolivia, a través de sus instituciones, ha fortalecido la ejecución de actividades de prevención, detección temprana, diagnóstico y tratamiento de enfermedades transmitidas por vectores. La eficacia de este trabajo depende, en gran medida, de la capacitación del personal de salud, quienes, bajo los principios de la política SAFCI, son el primer punto de contacto con la población y garantizan la llegada de los servicios a quienes históricamente han tenido acceso limitado. Todo ello en cumplimiento de la Constitución Política del Estado, que establece el acceso universal y gratuito a la salud como un derecho fundamental.

En este contexto, presentamos el **Manual de procedimientos técnicos operativos para el diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis**, un documento esencial para fortalecer las competencias del personal de salud mediante capacitación continua en procedimientos de diagnóstico, de pacientes con leishmaniasis en sus diversas formas. Su implementación se se extenderá a nivel nacional, articulando acciones entre los distintos niveles de Gobierno nacional, departamental y municipal, así ratificamos nuestro compromiso con una atención en salud integral, equitativa y de calidad.



María Renée Castro Cusicanqui
MINISTRA DE SALUD Y DEPORTES

28 MAY 2025

VISTOS Y CONSIDERANDO:

Que, el Parágrafo I del Artículo 35 de la Constitución Política del Estado, señala que el Estado en todos sus niveles, protegerá el derecho a la salud, promoviendo políticas públicas orientadas a mejorar la calidad de vida, el bienestar colectivo y el acceso gratuito de la población a los servicios de salud.

Que, el Artículo 37 del Texto Constitucional, establece que el Estado tiene la obligación indeclinable de garantizar y sostener el derecho a la salud, que se constituye en una función suprema y primera responsabilidad financiera y se priorizará la promoción de la salud y la prevención de las enfermedades.

Que, el Artículo 3 del Código de Salud, aprobado por el Decreto Ley Nº 15629, de 18 de julio de 1978, dispone que corresponde al Poder Ejecutivo a través del Ministerio de Previsión Social y Salud Pública, al que este Código denominará Autoridad de Salud (actual Ministerio de Salud y Deportes), la definición de la política nacional de salud, la normación, planificación, control y coordinación de todas las actividades en todo el territorio nacional, en instituciones públicas y privadas sin excepción alguna.

Que, el inciso w) del Parágrafo I del Artículo 14 del Decreto Supremo Nº 4857, de 6 de enero de 2023, de Organización del Órgano Ejecutivo, determina que las Ministras y los Ministros del Órgano Ejecutivo, en el marco de las competencias asignadas al nivel central en la Constitución Política del Estado tienen como atribución, emitir Resoluciones Ministeriales, así como Biministeriales y Multimministeriales en coordinación con las Ministras(os) que correspondan, en el marco de sus competencias.

Que, los incisos b), d) y g) del Artículo 84 de la norma precitada, señalan entre las atribuciones de la Ministra (o) de Salud y Deportes, ejercer la rectoría, regulación y conducción sanitaria del sistema de salud; regular, planificar, controlar y conducir el Sistema Nacional de Salud, conformado por los subsectores de seguridad social de corto plazo, público y privado, así como la medicina tradicional; y promover la implementación del modelo de gestión y de atención en salud.

Que, mediante Acta de Reunión del Comité de Coordinación Técnica (COCOTEC), de 30 de octubre de 2024, se valida el documento técnico "Manual de Procedimientos Técnicos Operativos para el Diagnóstico de Laboratorio de las Leishmaniasis".

Que, a través del Acta de Comité de Identidad Institucional y Publicaciones, de 18 de marzo de 2025, se aprueba el documento "Manual de Procedimientos Técnicos Operativos para el Diagnóstico de Laboratorio de las Leishmaniasis", asignándole el número de publicación Nº 557, dentro la serie de Documentos Técnico Normativo.

Que el Informe Técnico MSyD/VPVEyMT/UPyCE/NI/357/2025, de 16 de abril de 2025, emitido por el Dr. Rene Rolando Terrazas Ortiz, Profesional Técnico de Monitoreo de Leishmaniasis, concluye señalando que el Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores dependiente de la Unidad de Prevención y Control de Enfermedades de la Dirección General de Epidemiología, solicita la emisión de la respectiva Resolución Ministerial, para la publicación del presente documento técnico normativo y su posterior implementación en los establecimientos de salud por el personal de salud a nivel nacional.

Que el Informe Legal MSyD/DGAJ/UAJ/IL/595/2025, de 20 de mayo de 2025, concluye que el "Manual de Procedimientos Técnicos Operativos para el Diagnóstico de Laboratorio de las Leishmaniasis", no contraviene las disposiciones jurídicas vigentes, por lo que resulta procedente la emisión de la Resolución Ministerial que apruebe dicho documento, en el marco de lo establecido en los incisos b), d) y g) del Artículo 84 del Decreto Supremo Nº 4857, de 6 de enero de 2023.

POR TANTO:

La **MINISTRA DE SALUD Y DEPORTES**, en uso de las atribuciones que le confiere el Decreto Supremo Nº 4857, de 6 de enero de 2023, Organización del Órgano Ejecutivo.

RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO.- APROBAR el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS OPERATIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS LEISHMANIASIS, asignado con el Nº 557, que en Anexo forma parte integrante e indisoluble de la presente Resolución Ministerial.

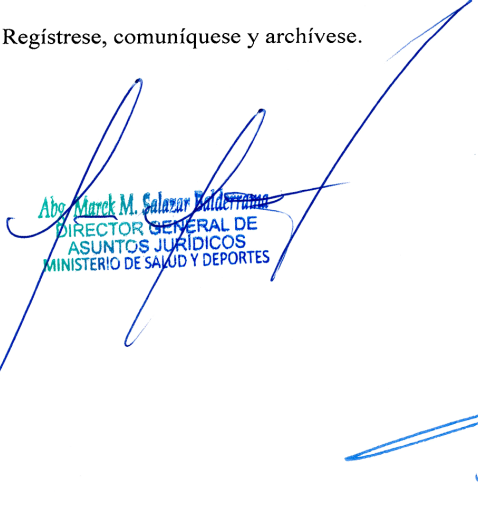


ARTÍCULO SEGUNDO.- AUTORIZAR a la Dirección General de Epidemiología, la impresión del mencionado documento, debiendo depositarse un ejemplar en Archivo Central del Ministerio de Salud y Deportes.

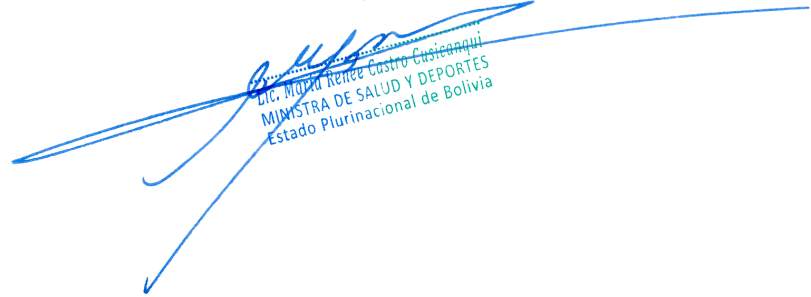
ARTÍCULO TERCERO.- La presente Resolución deberá ser publicada en la Página Web Institucional, <http://minsalud.gob.bo>.

ARTÍCULO CUARTO.- El Viceministerio de Promoción, Vigilancia Epidemiológica y Medicina Tradicional a través de la Dirección General de Epidemiología, queda encargado de la ejecución y difusión del mencionado documento.

Regístrese, comuníquese y archívese.


Abg. Marco M. Salazar
DIRECTOR GENERAL DE ASUNTOS JURIDICOS
MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES


Dr. Abg. Francisco Enriquez
VICEMINISTRO DE PROMOCIÓN Y VIGILANCIA
EPIDEMIOLOGIA Y MEDICINA TRADICIONAL
MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES


Abg. Renée Castro Cusiacaqui
MINISTRA DE SALUD Y DEPORTES
Estado Plurinacional de Bolivia



INTRODUCCIÓN

El Ministerio de Salud y Deportes es la entidad responsable de generar políticas y acciones que permitan garantizar el derecho a la salud de las y los bolivianos, al acceso universal y gratuito a todos los servicios de salud, con la implementación y desarrollo pleno e integral de la Política Nacional de Salud Familiar Comunitaria Intercultural (SAFCI) y del Sistema Único de Salud (SUS) con calidad y calidez para Vivir Bien.

El presente manual tiene como objetivo: incrementar la calidad de atención, mejorando las habilidades del personal de salud que realiza el diagnóstico laboratorial de las leishmaniasis a través de la estandarización de los procedimientos técnicos, la organización y funciones de la red nacional de laboratorios; estableciendo el sistema de control de calidad de diagnóstico y el desarrollo de acciones en relación al seguimiento como monitoreo en la red nacional de laboratorios para leishmaniasis.

Documento que deberá aplicarse en los laboratorios de diagnóstico de los subsectores público, seguridad social a corto plazo y privado. El cual en su segunda edición se encuentra estructurado en seis partes: I) Antecedentes, II) Aspectos generales de la leishmaniasis, III) Organización y funciones de la red nacional de laboratorios para el diagnóstico de la leishmaniasis, IV) Procedimientos técnicos operativos de laboratorio para el diagnóstico de la leishmaniasis, V) Sistema de control de calidad del diagnóstico de leishmaniasis y VI) Seguimiento y monitoreo.

En la última década se estima un promedio de 2.100 casos nuevos reportados por año, de los cuales la forma predominante es la leishmaniasis cutánea seguida de la mucosa, mucocutánea y visceral, estas últimas pueden llevar a la presencia de secuelas desfigurantes como: cicatrices en piel, deformaciones en fosas nasales, cavidad oral; siendo potencialmente mortal en niños/niñas menores de dos años en el caso de la leishmaniasis visceral. El inicio del tratamiento oportuno de esta enfermedad parte de la confirmación de la sospecha clínica a través del diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis.

Al finalizar la gestión 2021 se tuvo la notificación de dos casos de leishmaniasis visceral residentes en el municipio de Villa Montes del departamento de Tarija, durante la gestión 2022 se tuvo la notificación de 22 casos nuevos para leishmaniasis visceral en este municipio y Roboré, en la gestión 2023 cuatro casos nuevos y al finalizar la gestión 2024 seis casos.

En la primera edición de este documento no se detallaba el procedimiento para el diagnóstico laboratorial de leishmaniasis visceral, así como el diagnóstico por histopatología; en el presente se hace conocer los mismos.

CONTENIDO

PARTE I

| | |
|---------------------------------------|----|
| Antecedentes..... | 19 |
| 1. Marco normativo | 20 |
| 2. Alineación con las políticas | 20 |
| 3. Justificación..... | 21 |
| 4. Objetivos | 22 |
| 4.1. Objetivo general | 22 |
| 4.2. Objetivos específicos | 22 |
| 5. Alcance | 22 |

PARTE II

| | |
|---|----|
| Aspectos generales de la leishmaniasis..... | 23 |
| 1. Ciclo de vida..... | 23 |
| 2. Presentación clínica de la enfermedad en humanos | 25 |
| 2.1. Leishmaniasis cutánea | 25 |
| 2.2. Leishmaniasis cutánea diseminada | 26 |
| 2.3. Leishmaniasis cutánea difusa | 26 |
| 2.4. Leishmaniasis mucocutánea y mucosa | 26 |
| 2.5. Leishmaniasis visceral | 27 |

PARTE III

| | |
|--|----|
| Organización y funciones de la red nacional de laboratorios para el diagnóstico de leishmaniasis..... | 29 |
| 1. Laboratorio de Nivel I | 31 |
| 1.1. Funciones técnico-administrativas | 31 |
| 1.2. Equipos, reactivos, materiales e insumos..... | 32 |
| 2. Laboratorio Nivel II | 32 |
| 2.1. Funciones técnico-administrativas | 32 |
| 2.2. Equipos, reactivos, materiales e insumos..... | 33 |
| 3. Laboratorio de Nivel III | 33 |
| 3.1. Funciones técnico-administrativas | 33 |
| 3.2. Equipos, reactivos, materiales e insumos..... | 35 |
| 4. Laboratorio de Nivel IV | 35 |
| 4.1. Funciones técnico-administrativas | 35 |
| 4.2. Equipos, reactivos, materiales e insumos..... | 36 |

PARTE IV

| | |
|---|----|
| Procedimientos técnicos operativos de laboratorio para el diagnóstico de las leishmaniasis | 37 |
| 1. Diagnóstico de laboratorio de la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y mucosa | 39 |
| 1.1. Exámen parasitológico directo (EPD) o frotis | 39 |
| 1.2. Diagnóstico histopatológico | 49 |

| | |
|---|----|
| 1.3. Cultivo | 51 |
| 1.4. Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos | 56 |
| 2. Diagnóstico de laboratorio de la leishmaniasis visceral..... | 61 |
| 2.1. Prueba rápida inmunocromatográfica | 61 |
| 3. Referencia de muestras | 63 |

PARTE V

| | |
|---|----|
| Sistema de control de calidad del diagnóstico de leishmaniasis..... | 64 |
| 1. Supervisión | 64 |
| 1.1. Supervisión directa..... | 64 |
| 1.2. Supervisión indirecta..... | 65 |
| 2. Programa de control de calidad para el diagnóstico microscópico de leishmaniasis | 65 |
| 2.1. Metodología del programa de evaluación externa de desempeño (PEED)..... | 65 |
| 2.2. Metodología del control de calidad interno (CCI)..... | 67 |

PARTE VI

| | |
|----------------------------------|----|
| Seguimiento y monitoreo..... | 70 |
| Referencias bibliográficas | 71 |

ANEXOS

| | |
|---------------|----|
| Anexo 1 | 75 |
| Anexo 2 | 76 |
| Anexo 3 | 78 |
| Anexo 4 | 79 |
| Anexo 5 | 80 |
| Anexo 6 | 81 |
| Anexo 7 | 82 |

INDICE DE IMAGENES

| | |
|---|----|
| Imagen 1. Formas morfológicas de leishmania <i>spp.</i> | 23 |
| Imagen 2. Ciclo biológico de leishmania <i>spp.</i> | 24 |
| Imagen 3. Casos de leishmaniasis por municipio de transmisión | 28 |
| Imagen 4. Laboratorios según nivel de organización | 29 |
| Imagen 5. Algoritmo general de diagnóstico de la leishmaniasis cutánea, mucocutánea y mucosa..... | 37 |
| Imagen 6. Algoritmo general de diagnóstico de la leishmaniasis mucosa. | 38 |
| Imagen 7. Algoritmo general de diagnóstico de la leishmaniasis visceral..... | 39 |
| Imagen 8. Observación microscópica de láminas | 48 |
| Imagen 9. Aspirado de borde de la lesión cutánea | 52 |
| Imagen 10. Esquema general de la extracción de ADN..... | 57 |
| Imagen 11. Procedimiento de amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). | 59 |
| Imagen 12. Corrida electroforética en gel de agarosa | 60 |

INDICE DE FOTOGRAFIAS

| | |
|--|----|
| Fotografía 1. Lesiones típicas de leishmaniasis cutánea | 25 |
| Fotografía 2. Tipos de lesiones cutáneas de leishmaniasis | 25 |
| Fotografía 3. Evolución de lesión - leishmaniasis cutánea..... | 25 |
| Fotografía 4. Leishmaniasis cutánea diseminada | 26 |
| Fotografía 5. Leishmaniasis cutánea difusa | 26 |
| Fotografía 6. Leishmaniasis mucocutánea y mucosa..... | 27 |
| Fotografía 7. Leishmaniasis visceral | 27 |
| Fotografía 8. Examen Parasitológico Directo (EPD). | 44 |
| Fotografía 9. Tinción giemsa. | 46 |
| Fotografía 10. Histopatología. | 50 |
| Fotografía 11. Manejo de parásitos en cultivo in-vitro de leishmania <i>spp.</i> | 54 |
| Fotografía 12. Cultivo in-vitro de leishmania <i>spp.</i> | 55 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Pruebas por nivel de complejidad de laboratorio..... | 30 |
| Tabla 2. Preparación de giemsa al 10% (dilución 1/10) según el número de láminas. | 46 |
| Tabla 3. Condiciones de amplificación | 58 |
| Tabla 4. Grado de concordancia de acuerdo a valor del índice Kappa..... | 67 |

ABREVIATURAS Y SIGLAS

| | |
|----------|---|
| BPL | Buenas Prácticas de Laboratorio |
| CCD | Controles de Calidad Directo |
| CCI | Controles de Calidad Interno |
| CDC | Centro de Enfermedades Contagiosas (Communicable Disease Center) |
| CENETROP | Centro Nacional de Enfermedades Tropicales |
| EPD | Examen Parasitológico Directo |
| INLASA | Instituto Nacional de Laboratorios de Salud |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización Panamericana de la Salud |
| PBS | Tampón de solución salina de fosfato (Phosphate buffered saline) |
| PCCI | Programa de Control de Calidad Interno |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase chain reaction) |
| PDES | Plan de Desarrollo Económico y Social |
| PEED | Programa de Evaluación Externa del Desempeño |
| PEI | Plan Estratégico Institucional |
| PGDES | Plan General de Desarrollo Económico y Social |
| PNETV | Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores |
| PSDI | Plan Sectorial de Desarrollo Integral |
| RFLP | Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (Restriction fragment length polymorphism) |
| SAFCI | Salud Familiar Comunitaria Intercultural |
| SEDES | Servicio Departamental de Salud |
| SPIE | Sistema de Planificación Integral del Estado |
| SUS | Sistema Único de Salud |

PARTE I

ANTECEDENTES

El Ministerio de Salud y Deportes es la entidad responsable de generar políticas y acciones que permitan garantizar el derecho a la salud de las y los bolivianos, al acceso universal y gratuito a todos los servicios de salud, con la implementación y desarrollo pleno e integral de la Política Nacional de Salud Familiar Comunitaria Intercultural (SAFCI) y del Sistema Único de Salud (SUS) con calidad y calidez para Vivir Bien.

El Estado Plurinacional de Bolivia, con una extensión de 1.098.581 Km² de territorio, tiene una población de 11.312.620 habitantes de acuerdo con los datos oficiales de población obtenidos en el Censo de marzo de 2024 (INE-CPV) - Instituto Nacional de Estadística (INE).

El 70% del territorio corresponde a zonas tropicales y subtropicales. Es considerada zona endémica para la leishmaniasis el 60% del territorio nacional, con excepción de Oruro y Potosí, quienes notifican casos importados de otras regiones y de otros países, el resto de los departamentos presentan casos autóctonos en municipios específicos.

En la última década se estima un promedio de 2.100 casos nuevos reportados por año, de los cuales la forma predominante es la leishmaniasis cutánea seguida de la mucosa, mucocutánea y visceral, estas últimas pueden conllevar a la presencia de secuelas desfigurantes como: cicatrices en piel, deformaciones en fosas nasales, cavidad oral; siendo potencialmente mortal en niñas/niños menores de dos años en el caso de la leishmaniasis visceral.

El inicio del tratamiento oportuno de esta enfermedad parte de la confirmación de la sospecha clínica a través del diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis.

Actualmente en el Estado Plurinacional de Bolivia se cuenta con las dos formas de presentación de leishmaniasis: la tegumentaria (piel y mucosas) y desde la gestión 2021 por un brote, la leishmaniasis visceral.

Este documento técnico normativo actualizado, orientará al personal de salud del área de laboratorio en los procedimientos diagnósticos, seguimiento del control de calidad y la gestión de suministros en los diferentes niveles de atención.

1. MARCO NORMATIVO

- Constitución Política del Estado Plurinacional de Bolivia, de 07 de febrero de 2009;
- Decreto - Ley N°15629, “Código de Salud” de 18 de julio de 1978;
- Ley N°1178, “Administración y Control Gubernamentales” de 20 de julio de 1990;
- Decreto Supremo N°29601, Modelo de atención y de Gestión en Salud en el marco de la Salud Familiar Comunitaria Intercultural-SAFCI, 11 de junio de 2008;
- Ley N°031, Marco de Autonomías y Descentralización “Andrés Ibáñez” de 19 de julio de 2010;
- Ley N°1152, de 20 de febrero de 2019. modificatoria a la Ley N°475 de 30 de diciembre de 2013, de Prestaciones de Servicios de Salud Integral del Estado Plurinacional de Bolivia, modificada por Ley N°1069 de 28 de mayo de 2018 “Hacia el Sistema Único de Salud, Universal y Gratuito”;
- Ley N°1407, Plan de Desarrollo Económico y Social 2021-2025, del 09 de noviembre de 2021;
- Decreto Supremo N°5164, de 29 de mayo de 2024, que modifica la estructura jerárquica del Ministerio de Salud y Deportes prevista en el Decreto Supremo N°4857, de 6 de enero de 2023, de Organización del órgano Ejecutivo;
- Resolución Ministerial N°0202, “Reglamento General para Habilitación de Laboratorios” de 22 de marzo de 2010;
- Resolución Ministerial N°1663, «Norma Nacional y Manual de Procedimientos Técnicos de Leishmaniasis» de 4 de diciembre de 2013;
- Resolución Ministerial N°0112, «Manual de normas y procedimiento técnico operativos de laboratorio para la leishmaniasis» de 20 de marzo de 2017;
- Resolución Ministerial N°0028, que otorga la «Nominación de Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis al Laboratorio de Parasitología-Entomología del Instituto de Laboratorios de Salud Néstor Morales Villazón INLASA» de 20 de enero de 2017;

Estas normativas proporcionan el marco jurídico necesario para la implementación de este manual, asegurando que las acciones propuestas se realicen conforme a la legislación vigente y contribuyan a mejorar la calidad de la atención en salud.

2. ALINEACIÓN CON LAS POLÍTICAS

El *“Manual de procedimientos técnicos operativos para el diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis”*, en atención al **Decreto Supremo N°29601 “Modelo de Salud Familiar Comunitario Intercultural”**, que contribuye en la eliminación de la exclusión social sanitaria (traducido como el acceso efectivo a los servicios integrales de salud); reivindica, fortalece y profundiza la participación social efectiva en la toma de decisiones en la gestión de salud (buscando la autogestión); brindando servicios de salud que tomen en cuenta a la persona, familia y comunidad; además de aceptar, respetar, valorar y articular la medicina biomédica con la medicina de los pueblos indígenas originarios campesinos, contribuyendo en la mejora de las condiciones de vida de la población. En el marco de la **“Ley N°1152 de 20 de febrero de 2019” - Ley modificatoria a la Ley N°475 de 30 de diciembre de 2013, de Prestaciones de Servicios de Salud Integral del Estado Plurinacional de**

Bolivia, modificada por Ley N°1069 de 28 de mayo de 2018 **“Hacia el Sistema Único de Salud, Universal y Gratuito”**.

Este documento por otra parte se encuentra alineado al pilar 3 “Salud, Educación y Deportes” del Plan General de Desarrollo Económico y Social (PGDES) y al eje 6 del Plan de Desarrollo Económico y Social (PDES) “Salud y deportes para proteger la vida con cuidado integral en tiempos de pandemia”, acción “Reducir el número de personas que presentan enfermedades transmisibles y no transmisibles”, con el propósito de mejorar la calidad de atención en salud al perfeccionar las habilidades del personal de salud en el diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis en el marco del Vivir Bien.

En este contexto, la Dirección General de Epidemiología - Unidad de Prevención y Control de Enfermedades, a través del Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores, contribuyen al Plan Sectorial de Desarrollo Integral para Vivir Bien (PSDI) Sector Salud 2021- 2025 y al Plan Estratégico Institucional (PEI) 2021-2025 a través de los indicadores Índice Parasitario anual IPA (Por 1.000 Hab.) y la disminución de la Tasa de incidencia de leishmaniasis.

3. JUSTIFICACIÓN

Las leishmaniasis son un complejo de enfermedades que afecta al ser humano que vive o visita áreas tropicales y subtropicales del país, donde la pobreza, precariedad de sus viviendas, desequilibrios inmunológicos en la población, colonización con desbosque, apertura de caminos, prospección petrolera, actividad minera, fluidez del desplazamiento poblacional a zonas endémicas y viceversa, contribuyen al incremento de casos.

En los últimos años, el Ministerio de Salud y Deportes ha fortalecido la prevención y control de las leishmaniasis a través de la otorgación gratuita de medicamentos, promoviendo en la población al cumplimiento de las medidas preventivas y de atención oportuna. El Sistema Único de Salud, Universal y Gratuito (SUS) permite a los establecimientos de salud públicos establecer en su cartera de servicios la oferta de atención integral a los pacientes con sospecha de leishmaniasis, permitiendo el acceso a pruebas diagnósticas para la confirmación de esta enfermedad según capacidades instaladas. El conjunto de estos laboratorios conforma la estructura de la red de diagnóstico para leishmaniasis, los cuales son supervisados y monitorizados por los laboratorios de referencia departamental y de referencia nacional.

El Ministerio de Salud y Deportes en coordinación con el Laboratorio de Parasitología - Entomología del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA), como Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis, publicó en la gestión 2017 el *“Manual de normas y procedimientos técnico operativos de laboratorio para la leishmaniasis”*. Por otra parte durante las gestiones 2021 y 2022 se presentó un brote de leishmaniasis visceral en el municipio de Villa Montes del departamento de Tarija, en esta oportunidad el contar con los procedimientos operativos para el diagnóstico de leishmaniasis visceral en los establecimientos de salud motivó a la revisión de documentos para la actualización de este manual. Una alternativa en el diagnóstico también es el diagnóstico histopatológico de lesiones cutáneas y mucocutáneas por los servicios de Anatomía Patológica y Citología de hospitales de referencia departamentales. Estas son parte de las razones por las que se consideró la revisión y actualización del contenido de la norma laboratorial vigente.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Incrementar la calidad de atención en salud al perfeccionar las habilidades del personal de salud en el diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir los procedimientos técnicos operativos directos e indirectos para el diagnóstico de laboratorio de las leishmaniasis.
- Establecer la organización y funciones de la red nacional de laboratorios de leishmaniasis.
- Mejorar las competencias técnico-operativas del personal de salud de laboratorio, implementando el sistema de control de calidad para el diagnóstico de las leishmaniasis.
- Realizar acciones de seguimiento y monitoreo en la red nacional de laboratorios para el adecuado diagnóstico de leishmaniasis

5. ALCANCE

Su aplicación se realizará en laboratorios de diagnóstico de leishmaniasis de los sub sectores de salud: público, privado y seguridad social a corto plazo a nivel nacional.

PARTE II

ASPECTOS GENERALES DE LA LEISHMANIASIS

Las leishmaniasis son un complejo de enfermedades infecciosas no contagiosas causadas por parásitos del género *Leishmania*. En el mundo, 22 especies de parásitos del género *Leishmania* han sido identificados como los agentes causales de las leishmaniasis en el humano, 15 especies están en las Américas y 7 en el Estado Plurinacional de Bolivia; 6 especies causantes de leishmaniasis tegumentaria (*L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. mexicana* y *L. amazonensis*) y *L. infantum* causante de leishmaniasis visceral (1). Es una zoonosis que afecta a los animales y al ser humano, se manifiestan como síndromes clínicos que pueden comprometer la piel, las mucosas y las vísceras.

Las leishmaniasis son transmitidas por dípteros de los géneros *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo, que se encuentran en regiones tropicales y subtropicales. Son enfermedades relacionadas con la pobreza, malnutrición y precarias condiciones de vivienda. Debido a su diversidad clínica, las lesiones pueden asemejarse a lesiones causadas por bacterias, hongos, insuficiencias vasculares, neoplasias y otros, por lo que es necesario realizar el diagnóstico confirmativo para un correcto tratamiento de la enfermedad.

1. CICLO DE VIDA

El parásito es un protozoo que durante su ciclo de vida presenta dos formas o estadios evolutivos: 1) los **promastigotes que miden entre 20 μm y 30 μm , tienen forma alargada, presenta un núcleo, un kinetoplasto y un largo flagelo en su extremo, se encuentra presente en el vector (invertebrado) y además es capaz de desarrollar en medios de cultivo específicos; y 2) los amastigotes, miden entre 2 μm y 5 μm , son ovoides e intracelulares obligados, carecen de flagelo y se multiplican en células del sistema fagocítico-mononuclear (principalmente macrófagos) del hospedador mamífero (vertebrado) (2) (IMAGEN 1.).**

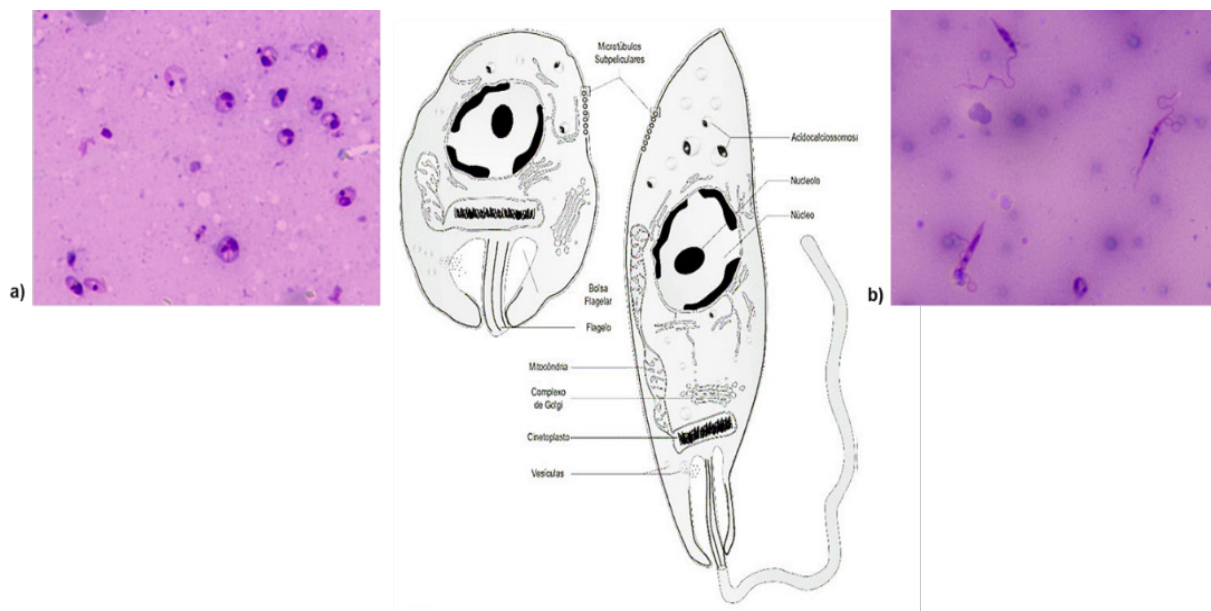


IMAGEN 1. FORMAS MORFOLÓGICAS DE *Leishmania* spp.:

a) Amastigote y b) Promastigote.

Fuente: Fotografías CENETROP, SEDES-Santa Cruz 2023, diseño esquemático de Théo Araujo-Santos extraído de Andrade 2022.

El ciclo de vida de *Leishmania* spp. involucra una fase en el hospedero invertebrado (insecto vector) y otra en el hospedero vertebrado (mamíferos). Cuando un flebótomo pica a un hospedero infectado, ingiere las formas amastigotes de *Leishmania* junto con la sangre. Dentro del mosquito, por metacicloogénesis los amastigotes se transforman en la forma promastigote. Cuando el flebótomo infectado pica a un humano u otro vertebrado mamífero, inocular los promastigotes del parásito en la sangre del hospedero.

A continuación, los promastigotes son fagocitados por macrófagos y células fagocíticas, dentro de los fagosomas los promastigotes se transforman en la forma amastigote, evadiendo así la respuesta inmunológica del hospedero. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria en el citoplasma de los fagocitos del hospedero y provocan la lisis del macrófago; los amastigotes libres infectan otros fagocitos y se propagan a tejidos y órganos mediante la destrucción y formación de lesiones dérmicas, mucosas o viscerales (IMAGEN 2.).

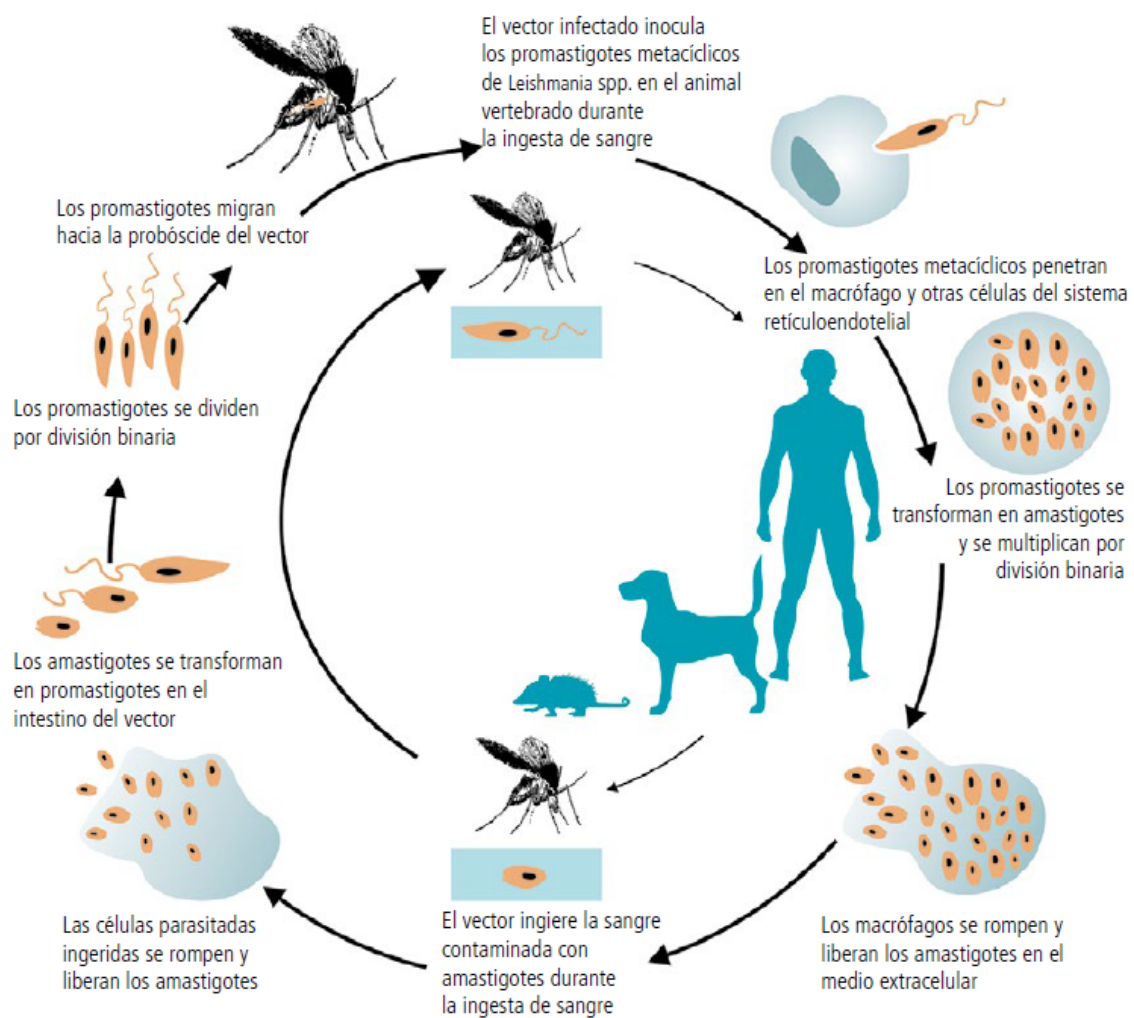


IMAGEN 2. CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania* spp.

Fuente: Manual de Procedimientos para la vigilancia y el control de las leishmaniasis en las Américas - OPS/OMS, 2023.

Las personas infectadas pueden o no desarrollar síntomas clínicos de la enfermedad, dependiendo de: 1) la respuesta inmunológica del hospedero; 2) la especie de *Leishmania* involucrada; 3) factores genéticos; y 4) factores ambientales, entre otros.

2. PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD EN HUMANOS

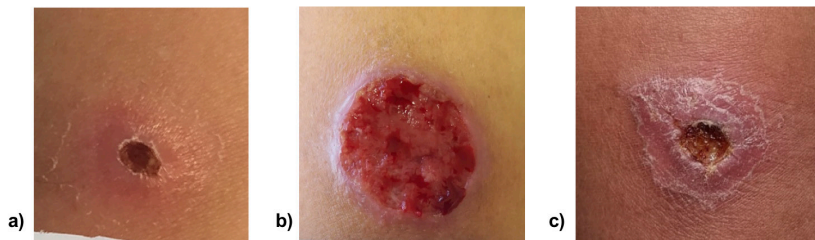
La enfermedad puede afectar a personas que viven o desarrollan actividades laborales en áreas tropicales y subtropicales; la importante inmigración de personas de la zona andina a la zona tropical y la explotación predatoria del bosque tropical son dos de las principales causas que están condicionando la aparición de nuevos focos de la enfermedad, haciendo que cada vez tenga mayor expansión geográfica y mayor magnitud cobrando notable importancia en la salud pública.

Las leishmaniasis se caracterizan por un gran polimorfismo clínico que pueden agruparse en:

2.1. LEISHMANIASIS CUTÁNEA

Puede ser simple o múltiple, es la forma más común y se caracteriza por la presencia de úlceras en la piel (**FOTOGRAFIA 1. y FOTOGRAFIA 2.**). Después de la picadura del flebótomo, se desarrolla una mácula de aproximadamente 0,5 cm de diámetro (periodo desde 2 días a 2 meses); el crecimiento del granuloma devela la formación de una pápula y nódulo que puede ser redondeado, indoloro hasta la forma ulcerada (**FOTOGRAFIA 3.**).

Estas lesiones aparecen frecuentemente en partes expuestas del cuerpo, algunos casos pueden curarse espontáneamente y otros pueden volverse crónicos. Por otra parte, se han descrito lesiones papulares persistentes en pacientes infectados por *Leishmania infantum*, estas lesiones son conocidas como *leishmaniasis cutánea atípica*.



FOTOGRAFIA 1. LESIONES TÍPICAS DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA

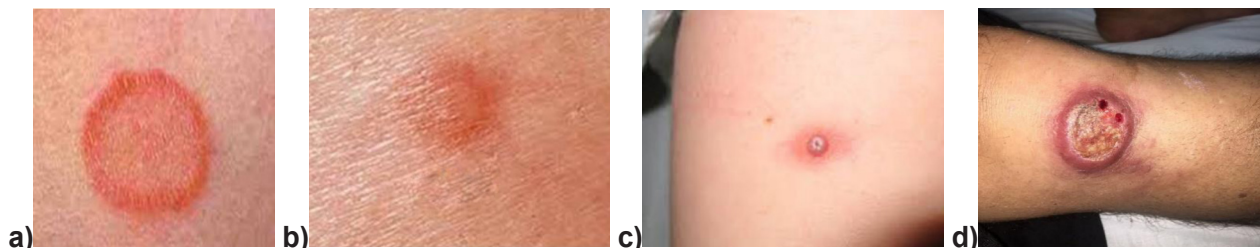
Fuente: Fotografías Ixiamas, SEDES-La Paz, Laboratorio de Parasitología – Entomología INLASA, 2023.



FOTOGRAFIA 2. TIPOS DE LESIONES CUTÁNEAS DE LEISHMANIASIS:

a) Ulcerativa, b) Infiltrativa, c) Nodular, d) Proliferativa, e) Verrucosa.

Fuente: Fotografías tomadas de Bermúdez et al., 2002.



FOTOGRAFIA 3. EVOLUCIÓN DE LESIÓN - LEISHMANIASIS CUTÁNEA:

a) Mácula, b) Pápula, c) Nódulo, d) Úlcera.

Fuente: Manual de diagnóstico y tratamiento de las leishmaniasis Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social 2018.

2.2. LEISHMANIASIS CUTÁNEA DISEMINADA

Aunque es poco frecuente, se caracteriza por la aparición de múltiples lesiones en forma de pápulas o acné en diferentes partes del cuerpo. Las lesiones pueden ser úlceras granulomatosas de bordes elevados diseminados por diferentes partes del cuerpo (**FOTOGRAFIA 4.**).



FOTOGRAFIA 4. LEISHMANIASIS CUTÁNEA DISEMINADA

Fuente: Atlas Interactivo de leishmaniasis OMS - 2023

2.3. LEISHMANIASIS CUTÁNEA DIFUSA

Es la manifestación clínica en la piel más grave por acción directa del parásito o una condición inmunitaria que impide que el hospedero responda en forma adecuada ante la infección. Se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones con gran contenido de parásitos, son lesiones muy parecidas a la lepra-lepromatosa (**FOTOGRAFIA 5.**).



FOTOGRAFIA 5. LEISHMANIASIS CUTÁNEA DIFUSA

Fuente: Atlas interactivo de leishmaniasis OMS – 2023.

2.4. LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA Y MUCOSA

La primera afecta tanto a piel como a mucosas, especialmente las de la nariz y boca; y la segunda puede afectar porciones más internas de las mucosas como la garganta. Pudiendo provocar la

destrucción del tejido mucoso y cartilaginoso, causando deformidades y graves mutilaciones. La enfermedad puede ser una complicación producto de una metástasis por vía hemática o linfática, por una lesión cutánea en la cara o por la picadura directa del vector en la mucosa (**FOTOGRAFIA 6.**).



FOTOGRAFIA 6. LEISHMANIASIS MUCOCUTÁNEA Y MUCOSA:

a) Leishmaniasis mucocutánea, b) Leishmaniasis mucosa.

Fuente: Fotografías Laboratorio de Parasitología - Entomología INLASA, 2023-2024

2.5. LEISHMANIASIS VISCERAL

Es la forma más grave y puede ser letal si no se trata. Los parásitos invaden órganos como el hígado, bazo, médula ósea y/o ganglios linfáticos. La mayoría de las personas infectadas son asintomáticas. Sin embargo, en personas sintomáticas se puede evidenciar cuadros febriles, hepatomegalia y esplenomegalia; además, en los casos más graves se evidencia pérdida de peso, anemia y palidez (**FOTOGRAFIA 7.**).



FOTOGRAFIA 7. LEISHMANIASIS VISCERAL

Fuente: Atlas Interactivo de leishmaniasis OMS – 2023.

De acuerdo al reporte epidemiológico de casos notificados al Ministerio de Salud y Deportes en la gestión 2023, se tienen veinte municipios con mayor presencia de casos de leishmaniasis (lugar probable de transmisión) (**IMAGEN 3.**).

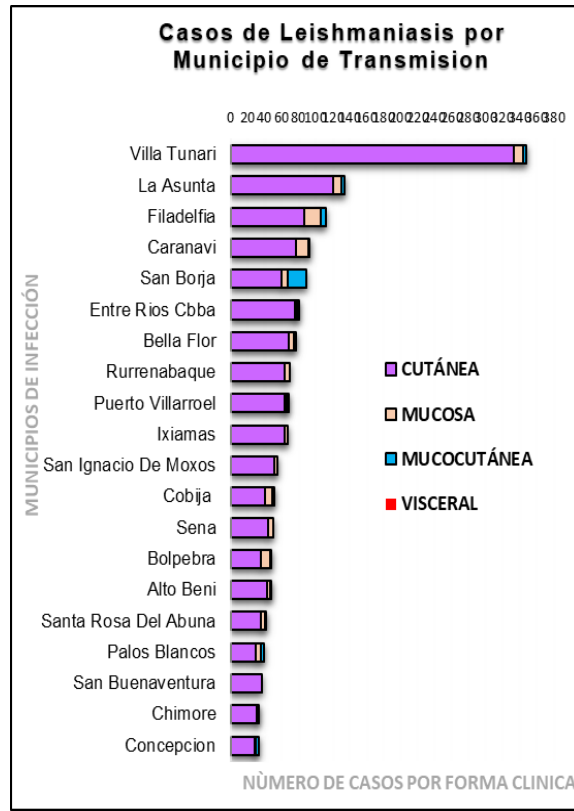
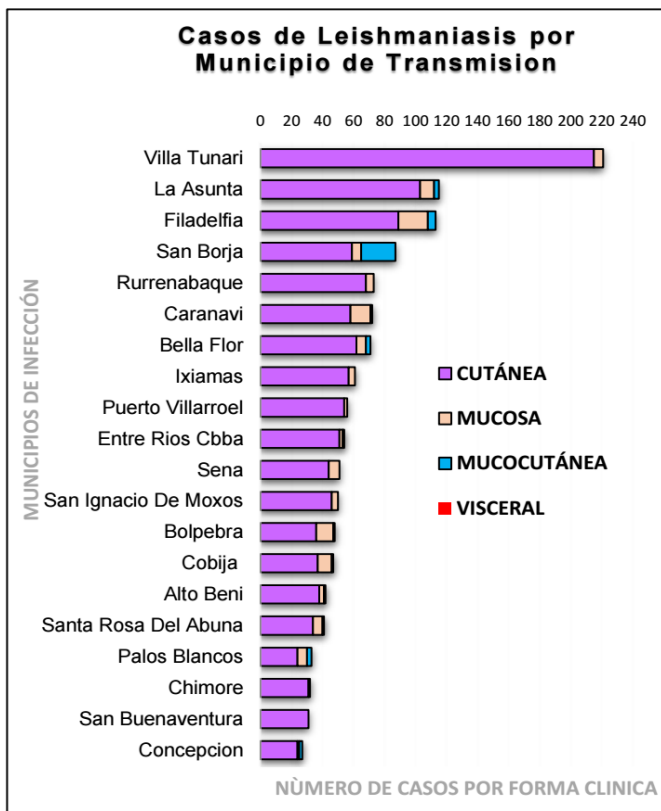


IMAGEN 3. CASOS DE LEISHMANIASIS POR MUNICIPIO DE TRANSMISIÓN

Fuente: PNVEyE - Ministerio de Salud y Deportes 2023 - 2024.

PARTE III

ORGANIZACIÓN Y FUNCIONES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS

Dentro de la estructura del Sistema Nacional de Salud, el laboratorio es un componente importante para el diagnóstico y vigilancia epidemiológica como control de cualquier enfermedad que sea un problema de salud pública. Los laboratorios cumplen funciones básicas de:

- Prevención, control y vigilancia de las enfermedades.
- Gestión de información y datos integrados.
- Implementación de pruebas de referencia y especializadas.
- Mejora y regulación del laboratorio mediante la implementación de estándares de calidad y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).
- Preparación y respuesta en salud pública (epidemias y pandemias).
- Investigación relacionada con la salud pública.
- Capacitación y actualización (formación de personal de laboratorio).

La red nacional de laboratorios para el diagnóstico de las leishmaniasis, es el conjunto de laboratorios establecidos según niveles y competencias; genera información útil para la vigilancia y control de la enfermedad, para la planificación y evaluación de las actividades del programa en todos los niveles. Realizan el diagnóstico de las leishmaniasis mediante métodos estandarizados, validados, verificados y controlados a nivel nacional, mediante: 1) Examen Parasitológico Directo (EPD), 2) Prueba inmunocromatográfica rK39, 3) Cultivo parasitológico, 4) Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos y 5) Tipificación molecular de especies (**TABLA 1.**), **para asegurar que todos los pacientes tengan acceso a un diagnóstico efectivo, confiable y oportuno, cumpliendo con los criterios de calidad.**

Los laboratorios de la red nacional de laboratorios para el diagnóstico de las leishmaniasis deben estar establecidos de acuerdo con la caracterización de laboratorios inscritos en el “Manual de requisitos para habilitación y funcionamiento de laboratorios” del Ministerio de Salud y Deportes (Publicación 165; serie: Documentos Técnico Normativos); asimismo, la red nacional de laboratorios de leishmaniasis está constituida por el Laboratorio de Nivel IV (Laboratorio Nacional de Referencia), Laboratorio de Nivel III (Laboratorios de Referencia Departamentales), Laboratorios de Nivel II y Laboratorios de Nivel I (Laboratorios de Referencia Municipal) (IMAGEN 4.).

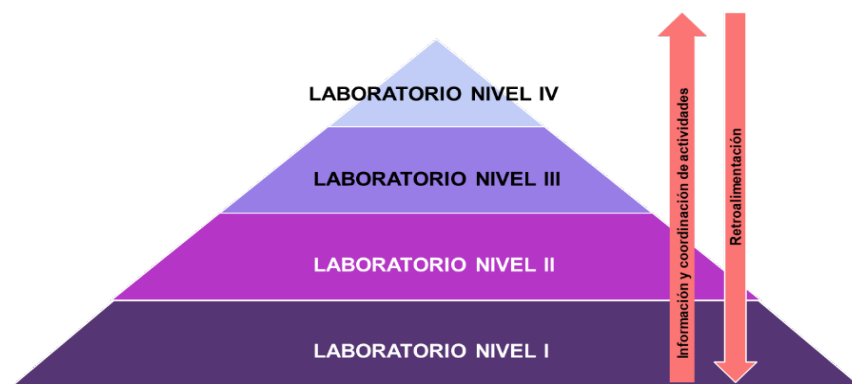


IMAGEN 4. LABORATORIOS SEGÚN NIVEL DE ORGANIZACIÓN

Fuente: Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores - MSyD 2024

Todos los niveles se encuentran conectados entre sí, donde la información de calidad se genera desde los laboratorios de Nivel I hasta llegar al Laboratorio de Referencia Nacional; la retroalimentación y coordinación de actividades se genera desde el Laboratorio de Referencia Nacional hasta los Laboratorios de Nivel I. La complejidad y capacidad resolutoria de cada nivel se relaciona acorde a las pruebas que se realizan (TABLA 1.). Así mismo sus actividades están enmarcadas bajo el Sistema Único de Salud (SUS), Ley N°1152 vigente desde el 20 de febrero de 2019.

TABLA 1. PRUEBAS POR NIVEL DE COMPLEJIDAD DE LABORATORIO

| NIVEL DE LABORATORIO | EXAMEN PARASITOLÓGICO DIRECTO | PRUEBA RÁPIDA RK-39 | CULTIVO | BIOLOGÍA MOLECULAR | CARACTERIZACIÓN MOLECULAR | PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD IN-VITRO |
|----------------------|-------------------------------|---------------------|---------|--------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| NIVEL I | SI | SI | NO | NO | NO | NO |
| NIVEL II | SI | SI | SI | NO | NO | NO |
| NIVEL III | SI | SI | SI | SI | NO | NO |
| NIVEL IV | NO | NO | SI | SI | SI | SI |

Fuente: Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores - MSyD 2024.

Las actividades que cumple la Red Nacional de Laboratorios de Leishmaniasis obedecen a una estructura administrativa definida y establecida por el Ministerio de Salud y Deportes. Se han establecido perfiles técnicos para cada nivel de complejidad de los laboratorios:

- Laboratorios Nivel I
- Laboratorios Nivel II
- Laboratorios Nivel III
- Laboratorio Nivel IV

Los niveles descritos no trabajan en forma aislada, sino que deben coordinar sus actividades para que su trabajo sea eficaz, de modo que, si un problema técnico no puede resolverse en un nivel, se remita al siguiente nivel de mayor complejidad o capacidad resolutoria.

Esto establece que los laboratorios de los diferentes niveles desarrollen tareas técnico-operativas y administrativas como:

- Organización y coordinación.
- Planificación y evaluación.
- Normalización.
- Capacitación.
- Gestión de calidad.
- Gestión de recursos, información y análisis de indicadores.

1. LABORATORIO DE NIVEL I

Son laboratorios ubicados en establecimientos de salud que cuentan con el equipamiento básico de laboratorio, tienen los suministros y el personal está capacitado para realizar el Examen Parasitológico Directo (EPD) y la prueba inmunocromatográfica rK39. Administrativamente dependen del Gobierno Autónomo Municipal, donde se encuentran ubicados y funcionalmente de la Coordinación de Red de Salud del Servicio Departamental de Salud (SEDES) de cada departamento.

1.1. FUNCIONES TÉCNICO-ADMINISTRATIVAS

- Ejecuta procedimientos analíticos y técnicas normadas correspondientes a su nivel de complejidad.
- Conserva y mantiene actualizados los cuadernos de registros de laboratorio (base de datos), resultados e informes de laboratorio.
- Implementa un sistema de referencia y contrarreferencia de muestras y pacientes.
- En los casos que lo ameriten, toma muestras para pruebas de mayor complejidad y coordina su transporte a laboratorios de mayor complejidad para su procesamiento y/o confirmación diagnóstica.
- Cumple con el Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) y el Programa de Control de Calidad Interno (PCCI).
- Realiza la solicitud de necesidades y requerimientos de su laboratorio, para responder a las necesidades de diagnóstico y toma de muestras para pruebas de mayor complejidad, para su incorporación en el presupuesto del establecimiento de salud.
- Cumple con las normas de bioseguridad en los procedimientos analíticos, en la toma de muestras, su procesado y transporte.
- Asegura el correcto almacenamiento de insumos y reactivos, así como el mantenimiento de microscopios.
- Participa en las actividades de capacitación, información y actualización programadas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis y aprobadas por el SEDES correspondiente.
- Capacita permanentemente a su personal a través de planes de capacitación.
- Coordina actividades con laboratorios de mayor complejidad como con el Laboratorio Municipal o de la Red de Salud (II), de Referencia Departamental (III) y de Referencia Nacional de Leishmaniasis (IV), además del componente leishmaniasis del Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Deportes.
- Participa activamente en la vigilancia epidemiológica municipal, departamental/regional y nacional, asegurando que todos los casos confirmados sean reportados.
- Envía información semanal al Laboratorio Municipal o de la Red de Salud (II) (Cuaderno de registro de laboratorio/base de datos, con copia al Laboratorio de Referencia Departamental de Leishmaniasis).
- Colabora con el desarrollo de investigaciones acordes con las prioridades regionales y nacionales.

1.2. EQUIPOS, REACTIVOS, MATERIALES E INSUMOS

Serán requeridos, de acuerdo con la capacidad analítica para desarrollar técnicas de diagnóstico directo de las leishmaniasis y Nivel de Laboratorio I, estos materiales, insumos y reactivos se encuentran descritos en el apartado de métodos de diagnóstico del presente manual.

2. LABORATORIO NIVEL II

Son laboratorios de los centros de salud cuya capacidad para el procesamiento de muestras responde a las necesidades de diagnóstico por Examen Parasitológico Directo (EPD) y prueba inmunocromatográfica rK39, y dependiendo de sus capacidades técnicas podrán realizar: cultivo. Administrativamente dependen del Gobierno Autónomo Municipal y técnicamente del Laboratorio de Referencia Departamental.

2.1. FUNCIONES TÉCNICO-ADMINISTRATIVAS

- Ejecuta los procedimientos analíticos y técnicas normadas correspondientes a su nivel de complejidad (Nivel II).
- Conserva y mantiene actualizados los cuadernos de registros de laboratorio (base de datos), resultados e informes de laboratorio.
- Implementa un sistema de referencia y contrarreferencia de muestras y pacientes.
- En los casos que lo ameriten, toma muestras para pruebas de mayor complejidad y coordina su transporte a laboratorios de mayor complejidad para su procesamiento o confirmación diagnóstica.
- Cumple con el Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) y el Programa de Control de Calidad Interno (PCCI).
- Realiza la solicitud de necesidades y requerimientos de su laboratorio, para responder a las necesidades de diagnóstico (Nivel II) y toma de muestras para pruebas de mayor complejidad, para su incorporación en el presupuesto del establecimiento de salud.
- Cumple con las normas de bioseguridad en los procedimientos analíticos, en la toma de muestras, su procesado y transporte.
- Asegura el correcto almacenamiento de insumos y reactivos.
- Realiza el mantenimiento preventivo de los equipos de acuerdo con la frecuencia recomendada por el fabricante, en coordinación con la jefatura del laboratorio.
- Participa en las actividades de capacitación e información programadas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis y aprobadas por el SEDES correspondiente.
- Capacita permanentemente a su personal y de los laboratorios Nivel I a través de planes de capacitación.
- Promueve el trabajo coordinado de laboratorios de Nivel I que comprenden su red.
- Supervisa actividades de los laboratorios Nivel I que comprenden su red, en lo que respecta al cumplimiento de los procedimientos analíticos y técnicas normadas, las normas de bioseguridad

en los procedimientos analíticos, en la toma de muestras, el transporte de las mismas, además del almacenamiento de insumos y reactivos, como el mantenimiento de equipos.

- Coordina actividades con laboratorios de mayor complejidad como con el Laboratorio de Referencia Departamental (III) y de Referencia Nacional de Leishmaniasis (IV), además del componente de leishmaniasis del Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Deportes.
- Participa activamente en la vigilancia epidemiológica municipal, departamental/regional y nacional, asegurando que todos los casos confirmados sean reportados.
- Envía información semanal al Laboratorio de Referencia Departamental (III) (Cuaderno de registro de laboratorio/base de datos, consolidado con el Nivel I, con copia al Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis).
- Colabora con el desarrollo de investigaciones acordes con las prioridades Regionales y Nacionales.

2.2. EQUIPOS, REACTIVOS, MATERIALES E INSUMOS

Serán requeridos, de acuerdo con la capacidad analítica para desarrollar técnicas de diagnóstico de la leishmaniasis y nivel de laboratorio II, estos materiales, insumos y reactivos se encuentran descritos en la descripción de las técnicas del presente manual.

3. LABORATORIO DE NIVEL III

Son los Laboratorios de Referencia Departamental, administrativamente dependen del Gobierno Autónomo Departamental y funcionalmente de los Servicios Departamentales de Salud (SEDES), cuyas capacidades para el procesamiento de muestras responden a las necesidades de Examen Parasitológico Directo (EPD), prueba inmunocromatográfica rK39, cultivo, además de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional o tiempo real (dependiendo de su capacidad). El Laboratorio de Referencia Departamental depende técnicamente del Laboratorio de Referencia Nacional.

3.1. FUNCIONES TÉCNICO-ADMINISTRATIVAS

- Ejecuta los procedimientos analíticos y técnicas normadas correspondientes a su nivel de complejidad (Nivel III).
- Conserva y mantiene actualizados los cuadernos de registros de laboratorio (base de datos), resultados e informes de laboratorio.
- Implementa un sistema de referencia y contrarreferencia de muestras y pacientes.
- En los casos que lo ameriten y/o el laboratorio no pueda realizar pruebas de mayor complejidad (PCR), toma muestras y coordina su transporte al Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis (IV) para su procesamiento o confirmación diagnóstica.
- Cumple con el Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) y el Programa de Control de Calidad Interno (PCCI).
- Realiza la solicitud de necesidades y requerimientos de los insumos, reactivos y equipos necesarios para responder a las necesidades de diagnóstico en función al nivel de complejidad de su laboratorio, para responder a las necesidades de diagnóstico y toma de muestras para

pruebas de mayor complejidad (Nivel III: EPD, Cultivo y PCR), para la incorporación en el presupuesto del establecimiento de salud.

- Cumple con las normas de bioseguridad en los procedimientos analíticos, en la toma de muestras, su procesado y transporte.
- Cumple con el correcto almacenamiento de insumos y reactivos.
- Realiza gestiones con diferentes instancias gubernamentales, no gubernamentales, municipales, Programa Departamental de Leishmaniasis, así como con el componente de leishmaniasis del Programa Nacional de Enfermedades transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Deportes para satisfacer las necesidades de la Red Departamental de Laboratorios de Leishmaniasis tales como:
 - Mantenimiento preventivo y correctivo de equipos.
 - Adquisición de equipamiento.
 - Adquisición de insumos y reactivos.
 - Asignación de recursos humanos.
 - Recursos económicos para actividades de capacitación, supervisión y transporte de muestras.
 - Mejoramiento de infraestructura.
- Participa en las actividades de capacitación e información programadas por el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis.
- Capacita permanentemente a su personal y a los laboratorios Nivel II y I a través de planes de capacitación.
- Supervisa el desempeño de los laboratorios de niveles inferiores.
- Promueve el trabajo coordinado de los laboratorios de Nivel II y I que comprenden su red.
- Supervisa actividades de los laboratorios Nivel II y I que comprenden su red, en lo que respecta al cumplimiento de los procedimientos analíticos y técnicas normadas, las normas de bioseguridad en los procedimientos analíticos, en la toma de muestras, el transporte de las mismas además del almacenamiento de insumos, reactivos, y el mantenimiento de equipos.
- Coordina actividades con el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis (IV), además del componente de leishmaniasis del Programa Nacional de Enfermedades transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Deportes.
- Participa activamente en la vigilancia epidemiológica municipal, departamental/regional y nacional para establecer estrategias de diagnóstico, tratamiento oportuno y medidas de control de la leishmaniasis.
- Envía información semanal al Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis (Cuaderno de registro de laboratorio/base de datos consolidado con el Nivel I y II).
- Colabora con el desarrollo de investigaciones acordes con las prioridades regionales y nacionales.

3.2. EQUIPOS, REACTIVOS, MATERIALES E INSUMOS

Serán requeridos, de acuerdo con la capacidad analítica para desarrollar técnicas de diagnóstico directo de las leishmaniasis y Nivel de Laboratorio III, estos materiales, insumos y reactivos se encuentran descritos en la descripción de las técnicas del presente manual.

4. LABORATORIO DE NIVEL IV

Constituido por el Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis que realiza pruebas de diagnóstico, seguimiento, pruebas confirmatorias y vigilancia de mayor complejidad.

4.1. FUNCIONES TÉCNICO-ADMINISTRATIVAS

El Laboratorio de Referencia Nacional tiene la capacidad para realizar las siguientes funciones:

- Elabora documentos técnicos normativos que tienen como finalidad normar todos los procedimientos que se llevan a cabo dentro de la Red Nacional de Laboratorio de Leishmaniasis independientemente del nivel de complejidad que manejen, asegurando con ello la calidad de los procesos y la optimización de los recursos.
- Garantiza la ejecución del sistema de control de calidad del diagnóstico de leishmaniasis dentro de la red de laboratorios.
- Actualiza información sobre la capacidad técnica diagnóstica existente en el país, conociendo cuántos tipos de laboratorio existen, sus niveles de complejidad, cobertura, ubicación geográfica, accesibilidad, infraestructura, niveles de bioseguridad, equipos, recurso humano y la dependencia de salud a la que pertenecen.
- Desarrolla técnicas de EPD, cultivo de aislamiento y crioconservación de parásitos, además técnicas de biología molecular con propósitos investigativos y de diagnóstico.
- Fundamenta, estandariza y valida los métodos, técnicas y procedimientos que se desarrollaran en todos los niveles de acuerdo con su complejidad con la finalidad de ofrecer diagnóstico oportuno y de calidad, además genera información sobre la identificación taxonómica de vectores de leishmaniasis, por métodos biológicos y moleculares, para el mejoramiento del sistema de vigilancia entomológica, así también cuenta con una colección de vectores.
- Retroalimenta la información generada a toda la red y contribuye a la vigilancia epidemiológica y control de la leishmaniasis del país.
- Organiza, dirige y articula la red nacional de laboratorios de leishmaniasis.
- Realiza la asistencia técnica a las redes departamentales de laboratorios de leishmaniasis, programa capacitaciones, basadas en normas vigentes y procedimientos estandarizados, para todo el personal de la red nacional de laboratorios.
- Establece sistemas regulares y permanentes de control y mejora de la calidad, realizando supervisiones integrales, seguimiento y monitoreo de la aplicación de las normas a las redes departamentales de laboratorios de leishmaniasis, establece y elabora los Programas de Evaluación Externa e Interna de la Calidad.
- Realiza el diagnóstico de casos especiales que no hayan podido ser diagnosticados en laboratorios de niveles inferiores.

- Elabora proyectos de investigación, estudios referenciales y especializados.
- Tiene estrecha coordinación con organismos e instituciones referentes a nivel internacional.
- Participa de los Programas de Evaluación de Desempeño del Laboratorio de Referencia Supranacional.
- Consolida, sistematiza y analiza la información generada por las redes departamentales de laboratorios de leishmaniasis para enviarla a nivel nacional de acuerdo al ciclo y flujo de información, además de brindar información de la georreferenciación vectorial.
- Coordina técnicamente y de forma directa con el Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores del Ministerio de Salud y Deportes, depende técnica como administrativamente del Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis.

4.2. EQUIPOS, REACTIVOS, MATERIALES E INSUMOS

Serán requeridos, de acuerdo con la capacidad analítica para desarrollar técnicas de diagnóstico directo de la leishmaniasis y Nivel de Laboratorio IV, estos materiales, insumos y reactivos se encuentran descritos en el apartado de técnicas del presente manual.

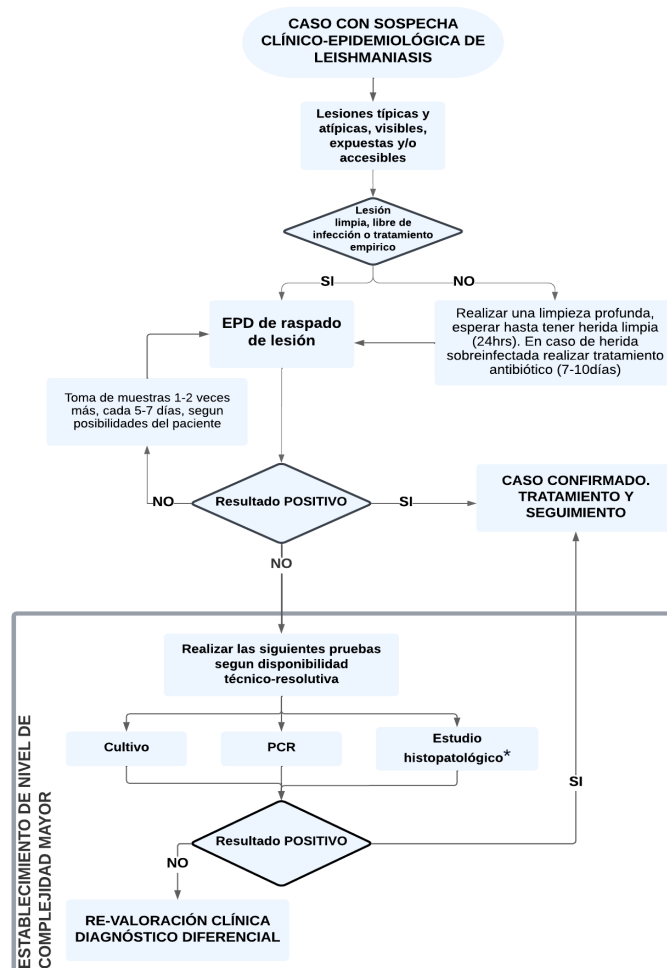
PARTE IV

PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS OPERATIVOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS LEISHMANIASIS

El diagnóstico de las leishmaniasis utiliza métodos directos para demostrar la presencia del parásito en lesiones cutáneas, mucosas y mucocutáneas e indirectos para la demostración de anticuerpos específicos en la leishmaniasis visceral.

El algoritmo de diagnóstico utilizado en la leishmaniasis cutánea, mucosa y mucocutánea, inicia con el Examen Parasitológico Directo (EPD) en caso de tener un resultado negativo, se repetirá una segunda toma de muestra. Si continuara el resultado negativo y la sospecha clínica como epidemiológica es característica, se solicitarán pruebas moleculares basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y/o el cultivo de aspirado de lesión.

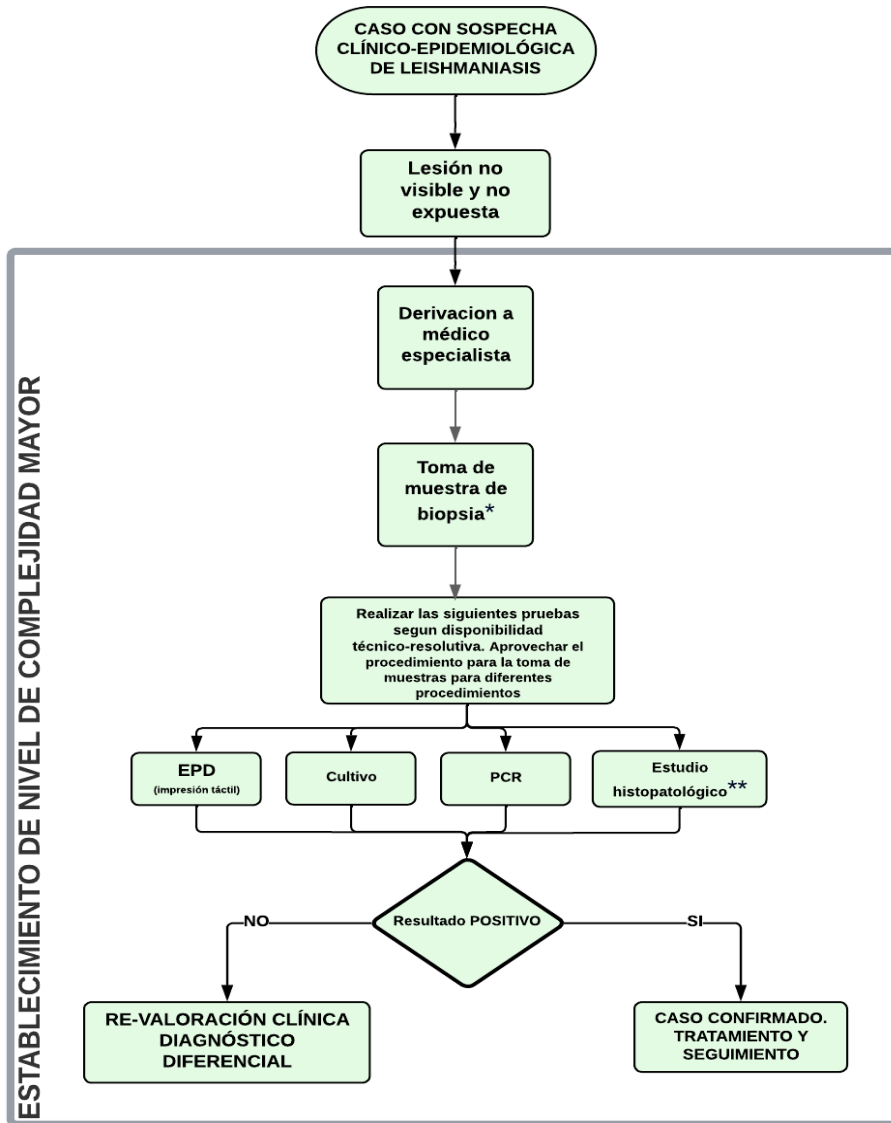
De persistir el resultado negativo se procederá a una reevaluación clínica y consideración del diagnóstico diferencial. En cambio, en la leishmaniasis visceral, se realizará la prueba inmunocromatográfica que permite la detección de anticuerpos específicos anti-rK39 de *Leishmania infantum* y *Leishmania chagasi*.



* Análisis complementario al diagnóstico diferencial.

IMAGEN 5. ALGORITMO GENERAL DE DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA, MUCOCUTÁNEA Y MUCOSA.

Fuente: Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores - MSyD 2024



* La muestra debe ser tomada en solución fisiológica, de preferencia suplementada con gentamicina y remitida lo antes posible a laboratorio para su procesamiento.

IMAGEN 6. ALGORITMO GENERAL DE DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS MUCOSA.

Fuente: Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores - MSyD 2024.

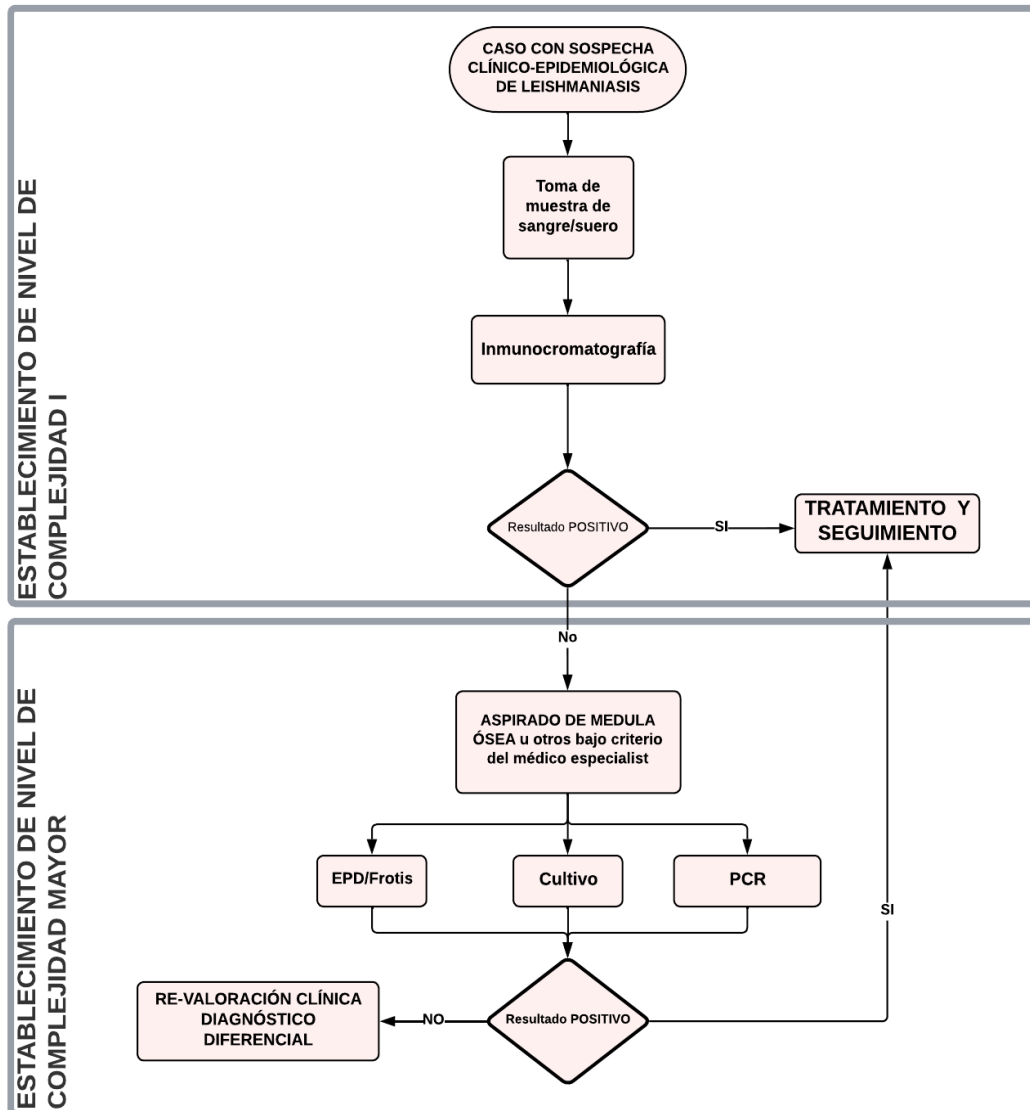


IMAGEN 7. ALGORITMO GENERAL DE DIAGNÓSTICO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL.

Fuente: Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores - MSyD 2024

1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA, MUCOCUTÁNEA Y MUCOSA

1.1. EXÁMEN PARASITOLÓGICO DIRECTO (EPD) O FROTIS

El Examen Parasitológico Directo (EPD) es el método de referencia para el diagnóstico de la leishmaniasis, consiste en la identificación de las formas amastigotes de *Leishmania spp.* por microscopía previa tinción, a través de la detección e identificación de sus estructuras características, como el núcleo, el kinetoplasto y la membrana celular.

Las muestras pueden ser obtenidas por: 1) raspado del borde de la lesión; 2) biopsias improntadas en láminas portaobjetos; y 3) aspirado de médula ósea (leishmaniasis visceral). La toma de muestra, procesamiento e identificación de formas amastigotes debe ser realizada por un personal capacitado.

La sensibilidad de la técnica depende de los siguientes factores:

- La localización de la lesión: La sensibilidad disminuye en lesiones mucosas.
- El tiempo de evolución de la lesión: La sensibilidad es mayor en lesiones menores a 6 meses de evolución con relación a las lesiones crónicas o de mayor tiempo de evolución.
- El estado de la lesión al momento de realizar la toma de muestra: La sensibilidad es mayor cuando la lesión es limpia y sin infección.
- El grado de infección: En úlceras con material purulento la sensibilidad es menor debido a la lisis o deformación de los parásitos dificultando su identificación. Se recomienda primero tratar la infección bacteriana o micótica y posteriormente proceder al diagnóstico para leishmaniasis.
- El uso de tratamientos previos: Las lesiones tratadas con cremas, ungüentos o medicinas tradicionales al momento de la toma de muestra pueden disminuir la sensibilidad del diagnóstico.
- La técnica de toma de muestra: La sensibilidad aumenta con el uso de bisturí Nro.15; en cambio, el uso de palito estéril puede ser útil en lesiones profundas y es menos invasiva.
- El número de láminas e improntas: La obtención de un mayor número de láminas aumentará la sensibilidad.
- La selección del área de la lesión: Los bordes de la lesión son áreas con mayor actividad parasitaria para la toma de muestra (áreas con inflamación e induración), aumenta la sensibilidad del método.
- La obtención de muestras de 2 o más sitios de la lesión, aumenta la sensibilidad del diagnóstico.

Bioseguridad

Con la finalidad de proteger al operador es importante seguir las prácticas de bioseguridad considerando las siguientes recomendaciones:

- Considerar toda muestra como potencialmente infecciosa.
- Utilizar equipo de protección individual: mandil, gorro, barbijo, lentes de protección y guantes descartables.
- Ambiente de toma de muestra: limpio, ventilado, iluminado y con privacidad. Siendo recomendable tener una camilla para toma de muestras de úlceras en lugares como cadera, zonas íntimas, muslos y pies.
- En caso de derrames y/o contaminación del ambiente, realizar inmediatamente la descontaminación de las áreas afectadas con alcohol etílico al 70% o hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Descartar el material contaminado y material cortopunzante siguiendo normas de bioseguridad.

- Manipular y transportar las muestras siguiendo normas de bioseguridad de transporte de muestras.
- Para el envío de las láminas, previamente fijadas con alcohol etílico (etanol) al 96% o metanol absoluto, deberán ser depositadas en porta láminas o envueltas en papel absorbente, luego en un recipiente secundario y este debe ser guardado en un tercer contenedor (triple empaque).

Toma de muestra con bisturí

Consideraciones previas

La muestra se debe obtener del sitio donde se sospeche que exista actividad parasitaria, generalmente el borde eritematoso, indurado y prominente, por ejemplo:

- En lesiones cutáneas y mucocutáneas típicas (lesión única con bordes levantados, color rosado, tejido granuloso y fondo limpio).
- En lesiones cutáneas atípicas (lesiones maculares, papulares, nodulares, verrucosas o placas).
- Lesiones mucosas visibles y accesibles en las que el uso del bisturí no ponga en riesgo la integridad del paciente.
- En caso de lesiones múltiples, elegir la que tenga menor tiempo de evolución, que presente características clínicas. Es recomendable tomar muestras de más de una lesión.

Materiales e insumos

- Guantes descartables.
- Gorro quirúrgico.
- Barbijo quirúrgico.
- Gasas estériles (de diferentes tamaños).
- Alcohol etílico al 70%.
- Solución fisiológica (0.9% de NaCl).
- Agua destilada estéril.
- Láminas o portaobjetos esmerilados nuevos y desengrasados.
- Bisturí Nro. 15 (por lesión).
- Porta bisturí Nro. 3.
- Porta agujas (para desmontar el bisturí).
- Baja lenguas.
- Porta láminas.
- Lápiz de punta carbón.
- Bolígrafo azul.

- Tela adhesiva microporosa.
- Lámpara o linterna
- Cuaderno de registro de laboratorio.
- Ficha epidemiológica.

Procedimiento

- Vestir el equipo de protección personal.
- Explicar al paciente el procedimiento, la técnica, el tiempo de entrega de los resultados y limitaciones de la técnica, aclarar sus dudas. Además, indicar al paciente que la toma de muestra puede ser dolorosa y que no se utilizan anestésicos; tomar especial atención en el caso de niños.
- Solicitar la aceptación del consentimiento informado al paciente.
- Registrar los datos del paciente en el cuaderno de registro de laboratorio y/o ficha epidemiológica.
- Lavarse las manos y colocarse los guantes descartables.

Nota.-

- El paciente debe recurrir al laboratorio con la herida limpia, libre de medicamentos o tratamientos empíricos para intentar sanar o cicatrizar la lesión. En este caso realizar la limpieza de la lesión, o solicitar al paciente que regrese a la toma de muestra cuando la herida este limpia (p.e. 24 horas después).
- En caso de que existiera una sobreinfección bacteriana realizar una limpieza profunda o de ser posible solicitar al médico tratamiento con antibióticos y volver a citar al paciente para la toma de muestra posterior a la conclusión del tratamiento (7-10 días).
- En caso de múltiples lesiones escoger la que tenga menor tiempo de evolución. De acuerdo con el caso, puede ser necesario tomar muestras de más de una lesión.
- En caso de que la lesión tenga costra, humedecer con solución fisiológica y retirarla cuidadosamente. Hacer nuevamente la limpieza de la lesión.

- Rotular en el extremo esmerilado de al menos 2 láminas o portaobjetos con el código del paciente, la fecha en la que se toma la muestra y las iniciales del nombre del paciente.
- Seleccionar la lesión más reciente y elegir los bordes más eritematosos, indurados y prominentes (indicadores de lesión activa) para realizar la toma de muestra.
- Proceder a la limpieza, con gasa estéril empapada con solución fisiológica, haciendo movimientos circulares del centro hacia la periferia de la lesión.

- Con el objetivo de disminuir el sangrado se deberá hacer presión durante 20 segundos con los dedos índice y pulgar en el área escogida para la incisión.
- Sin dejar de hacer presión, introducir la hoja de bisturí de forma horizontal orientando el filo hacia la parte externa de la lesión paralela al borde (5 mm de longitud por 3 mm de profundidad) y raspar el interior de la incisión. El material del raspado debe tener un aspecto grumoso o granular, lo que indica la presencia de células, y escasa cantidad de sangre.

Nota.-

- Si el material obtenido es abundante, hacer varias improntas a partir del mismo raspado.
 - Si el material es escaso, extraer más muestra con la misma hoja de bisturí de la misma incisión o de otra.
-
- Distribuir el material obtenido sobre una lámina o portaobjetos colocando la hoja del bisturí paralela al borde de la lámina, extendiendo el material obtenido suavemente y de forma circular, del centro hacia afuera, formando improntas (frotis) de 8 a 10 mm de diámetro aproximadamente. Cada lámina debe tener 3 improntas, generando por lo menos un total de 6 improntas por paciente (2 láminas).
 - Descartar la hoja de bisturí en el recipiente de cortopunzantes.
 - Al finalizar la toma de muestra, hacer presión en la lesión con una gasa estéril hasta controlar el sangrado, si hubiese, y cubrir con una gasa estéril y tela adhesiva microporosa.
 - Recomendar al paciente mantener la herida limpia, cubierta, no utilizar tratamientos empíricos para intentar sanar o cicatrizar la lesión.
 - Dejar secar las láminas totalmente, en posición horizontal sobre la mesa de trabajo, a temperatura ambiente, entre 15 a 20 minutos. Tomar las precauciones necesarias en climas cálidos y húmedos para evitar la contaminación o deterioro con agentes externos (p.e. hongos, esporas y rayos solares).



FOTOGRAFIA 8. EXAMEN PARASITOLÓGICO DIRECTO (EPD):

a) Lesión típica, b) Desinfección, c) Retiro de la costra, d) Lesión desinfectada y libre de costra, e) Hemostasia, f) Incisión con bisturí, g) Distribución de la muestra y h) Curación.

Fuente: Fotografías Laboratorio de Entomología y Parasitología INLASA, 2023

Tinción Giemsa

La tinción de Giemsa es una tinción de tipo Romanowsky de base alcohólica (metanol). El colorante es una mezcla de eosina (colorante ácido) y de azul de metileno (colorantes básicos).

Tiñe el núcleo y el kinetoplasto de azul-violeta intenso, el citoplasma de azul claro y la membrana celular bien definida de las formas amastigotes de *Leishmania spp.* También se tiñen los núcleos de los glóbulos blancos de un azul-violeta intenso, así también, los glóbulos rojos se tiñen de color rosa claro a grisáceo.

Nota. - Recomendaciones importantes para el manejo adecuado de la solución madre del colorante de Giemsa

- Guardar en un frasco de vidrio oscuro (ámbar), en un lugar frío, seco y sombreado, alejado de la luz solar directa.
- Mantenga el frasco bien tapado o cerrado para evitar la evaporación del colorante, su oxidación por la humedad y contaminación.
- Por ningún motivo añada agua a la solución madre del colorante Giemsa; incluso una cantidad mínima produciría el deterioro del colorante que lo volverá progresivamente ineficaz.
- Para las necesidades cotidianas, alicuotar pequeñas cantidades, de colorante, en frascos oscuros limpios y secos.
- No agite el frasco de colorante antes de utilizar. La agitación volvería a suspender los precipitados, que se asentarían en las extensiones durante la tinción y ocultarían detalles importantes durante el examen microscópico.
- Nunca devuelva el colorante preparado o no utilizado al frasco donde guarda la solución madre ni al frasco destinado al uso diario. Una vez que sale del frasco, el colorante debe usarse rápidamente o descartarse siguiendo las recomendaciones de bioseguridad.

Materiales, reactivos e insumos

- Alcohol etílico (etanol) al 96% o metanol absoluto.
- Agua destilada, agua desionizada, agua de consumo en botella o solución amortiguadora (pH 7.2 - 7.4).
- Colorante de Giemsa (solución madre).
- Vaso de precipitado de 50 mL.
- Probeta graduada de 10 mL.
- Pipeta Pasteur de plástico graduada descartable.
- Rejilla de tinción con cubeta o bandeja de tinción.
- Bandeja o gradilla de secado de láminas.
- Cronómetro o temporizador.

Procedimiento

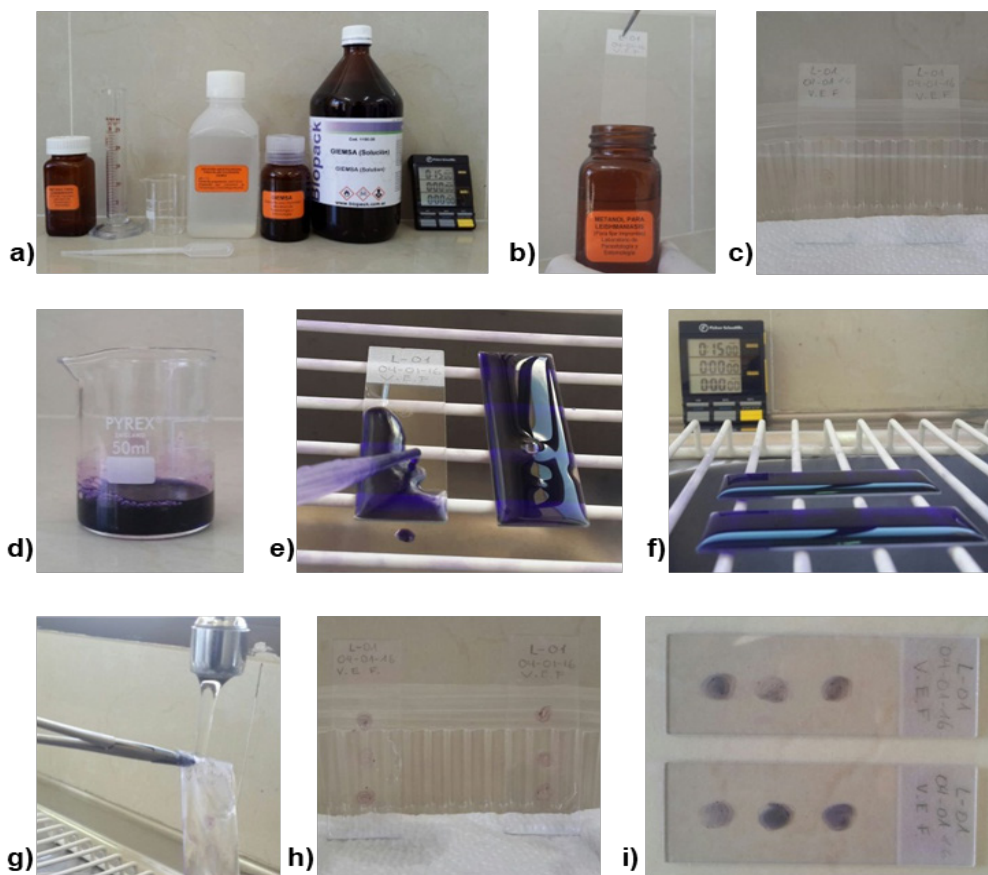
- Fijar la impronta sumergiéndola brevemente alcohol etílico al 96% (10 segundos) o metanol absoluto (5 segundos) y dejar secar evitando la exposición solar.
- En un vaso de precipitado pequeño prepare la solución Giemsa al 10% (dilución 1/10). Determine la cantidad de láminas a teñir y prepare según la TABLA 2.

**TABLA 2. PREPARACIÓN DE GIEMSA AL 10% (DILUCIÓN 1/10)
SEGÚN EL NÚMERO DE LÁMINAS.**

| CARACTERÍSTICAS | Dilución 1:10 (10%) | | | |
|--------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|
| | 2 LÁMINAS | 10 LÁMINAS | 15 LÁMINAS | 20 LÁMINAS |
| Giemsa | 1 mL | 10 mL | 15 mL | 20 mL |
| Agua destilada | 9 mL | 90 mL | 135 mL | 180 mL |
| HOMOGENIZAR | | | | |
| Concentración | 10% | 10% | 10% | 10% |
| Volumen final | 10 mL | 100 mL | 150 mL | 200 mL |

Fuente: Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores - MSyD 2024

- Colocar las láminas en la rejilla de tinción.
- Verter el colorante poco a poco sobre las láminas.
- Dejar teñir las improntas durante 15 minutos, o el tiempo estandarizado de acuerdo al colorante que se utilice en el laboratorio.
- Lavar las láminas con chorro suave de agua corriente o de grifo, evitando que el chorro de agua caiga sobre la muestra.
- Dejar secar las láminas en forma vertical a temperatura ambiente.



FOTOGRAFIA 9. TINCIÓN GIEMSA:

a) Materiales necesarios para la tinción; b) Fijación con metanol absoluto; c) Secado de láminas;
d) Dilución 1/10 del colorante Giemsa; e) y f) Tinción de láminas; g) Lavado de láminas; h) Secado de láminas e i) Láminas secas.

Fuente: Fotografías Laboratorio de Parasitología - Entomología INLASA, 2023.

Lectura de láminas

Equipos, materiales e insumos

- Microscopio binocular.
- Aceite de inmersión.
- Porta láminas (negativas y positivas).
- Papel absorbente.

Procedimiento

- Colocar la lámina sobre la platina del microscopio binocular y enfocar con el objetivo de menor aumento 4X o 10X.
- Localizar la muestra, adicionar una gota de aceite de inmersión sobre la muestra ubicada y enfocar con el objetivo de 100X.

Nota.- Características de una muestra de buena calidad

- Muestra óptima: A la observación macroscópica posee aspecto granular y a nivel microscópico las células se observan con una correcta morfología, escasa cantidad de hilos de fibrina, leucocitos abundantes y eritrocitos escaso con coloración adecuada (Leucocitos: núcleo de color azul-violeta intenso, citoplasma de color azul claro; Eritrocitos: color rosa pálido).
- Muestra inadecuada: A la observación macroscópica, carece de aspecto granular y es escasa; a nivel microscópico, abundantes glóbulos rojos o bacterias; abundante cantidad de hilos de fibrina y coloración no satisfactoria (presencia de precipitados de colorante o cristales).

- Proceder a buscar formas amastigote de Leishmania spp., intra o extracelulares, iniciando en un extremo y cubriendo toda la muestra en forma de zigzag horizontal o vertical. Tomar especial interés en sitios con abundante presencia leucocitaria.
- Para la interpretación de resultados: el resultado es positivo cuando en las improntas de la muestra examinada se ha observado al menos 1 amastigote intra o extracelular de Leishmania spp., con todas sus características (Núcleo: color azul-violeta oscuro; kinetoplasto: color violeta intenso; Citoplasma: color azul claro; membrana celular definida). Y el resultado es negativo cuando al recorrer todos los campos de todas las improntas de la muestra examinada no se ha observado ni una forma amastigote de Leishmania spp.

Nota.-

- No debe descartarse la presencia de Leishmania spp. con un solo resultado cuando no se observan formas amastigote en las improntas de lesión.
- En pacientes con evidencia clínica y epidemiológica de leishmaniasis, será necesario una segunda toma de muestra (el tiempo entre tomas de muestra estará sujeto a criterio del personal de laboratorio y condiciones particulares de cada paciente).

- Al finalizar la lectura proceder con la limpieza del microscopio y guardar las láminas en una caja porta láminas para control de calidad.
- Reportar los resultados en el cuaderno de registro de laboratorio.

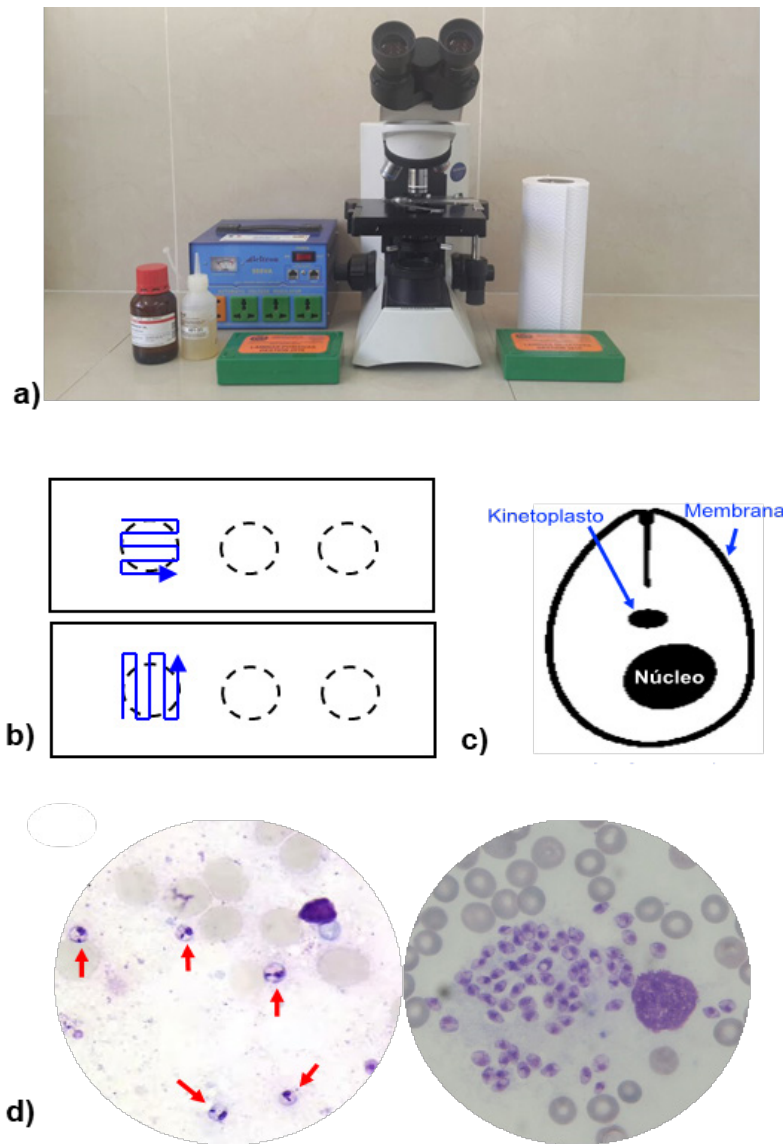


IMAGEN 8. OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LÁMINAS:

a) Microscopio y materiales necesarios para la lectura; b) Lectura de láminas en zigzag horizontal o vertical;
 c) Esquema de la estructura celular de un amastigote de Leishmania spp. y d) Amastigotes de Leishmania spp. observados con objetivo 100X.
Fuente: Fotografías Laboratorio de Parasitología - Entomología INLASA, 2023.

Reporte de resultados

Registrar los resultados en el cuaderno de registro de laboratorio y reportar como sigue:

- **Positivo:** Se observan formas amastigote de Leishmania spp. en la muestra examinada.
- **Negativo:** No se observan formas amastigote de Leishmania spp. en la muestra examinada.
- Un resultado negativo no descarta la enfermedad.

1.2. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

(*L. cutánea*, *L. mucocutánea* y *L. mucosa*)

Para realizar el estudio histopatológico es necesario tener una biopsia del sitio de la lesión, este procedimiento consiste en la obtención de tejidos u otros materiales procedentes del organismo vivo, para ser estudiado microscópicamente con fines diagnósticos y de investigación.

Este método de biopsia por sacabocado es considerado el procedimiento más adecuado para el diagnóstico de enfermedades dermatológicas, siendo que proporciona datos muy útiles para definir el diagnóstico del paciente, ya que permite obtener especímenes de piel o mucosa con espesor completo. Este procedimiento debe ser realizado por personal entrenado previamente.

La sensibilidad del estudio histopatológico es variable en un rango de 70-80 % permite realizar diagnósticos diferenciales principalmente con cuadros de malignidad; pero al mismo tiempo al ser considerada una técnica invasiva debe ser realizada por profesionales médicos con especialidad en anatomía patológica y dermatopatología, si bien permite identificar la presencia de los amastigotes como inclusiones intracitoplásmicas en macrófagos debe ser complementada por otros medios de diagnóstico para tipificar la especie de la Leishmania.

Propósito

Estandarizar la técnica de obtención de biopsia de piel o mucosa con sacabocado para optimizar los resultados y de esta forma minimizar los riesgos y complicaciones que implica el procedimiento.

Toma de muestra

Para la toma de muestras en el caso de *Leishmania cutánea* se debe tomar en cuenta:

- Utilizar un sacabocados de 4 a 6 m de diámetro; la muestra debe de tener una profundidad de al menos 5 mm.
- Para las lesiones tipo úlcera, características de la leishmaniasis cutánea se recomienda tomar la biopsia abarcando una porción del borde sano de la lesión ulcerosa y una parte ulcerada (1/3 de piel sana y 2/3 del borde de la lesión).
- Se debe escoger la lesión que tenga el menor tiempo de evolución y buscar los bordes más indurados que indiquen que la lesión está activa.

Para la toma de biopsias de tejido mucoso requiere la intervención de un médico especializado (otorrinolaringólogo) debido a que es necesario contar con un equipo médico especial como por ejemplo el rinoscopio. Una vez obtenida la muestra deber ser introducida inmediatamente en un frasco que contenga formol tamponado al 10%, debe estar bien sellada y vigilar que el espécimen no quede adherido a las paredes del frasco.

Marque debidamente el frasco con el nombre del paciente e indicando el sitio de la lesión, es recomendable que la muestra sea enviada lo más pronto posible al *médico especialista en Anatomía Patológica para su correspondiente y adecuada interpretación.*

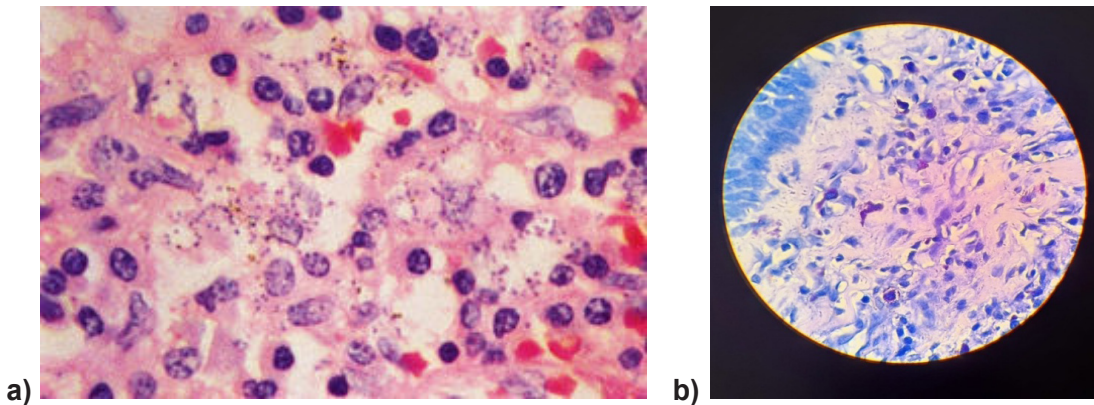
La muestra debe ser enviada con la orden para el estudio de histopatología adecuadamente llenada adjuntando un pequeño resumen de la historia clínica del paciente para la correlación clínico-patológica.

Metodología

Una vez en la Unidad de Patología, las biopsias son incluidas en bloques de parafina para poder realizar cortes en el micrótopo para luego fijarlas en láminas portaobjetos y ser coloreadas con la tinción Hematoxilina-Eosina; como complemento se utiliza la coloración de Giemsa con lo cual es posible visualizar de mejor manera los amastigotes de *Leishmania*.

Materiales, reactivos e insumos

- Formol 40%
- Alcohol corriente
- Alcohol absoluto
- Xilol
- Paraplast
- Batería de Tinción H y E - Giemsa
- Porta objetos – cubreobjetos
- Microscopio óptico



FOTOGRAFIA 10. HISTOPATOLOGÍA:

a) Tinción Hematoxilina-Eosina - b) Tinción Giemsa.

Fuente: Fotografías - Unidad de Anatomía Patológica y Citología Hospital de Clínicas - La Paz - Bolivia 2025.

Reporte de resultados

Registrar los resultados en el cuaderno de registro de laboratorio y reportar como sigue:

- **Positivo:** *Se observan amastigotes de Leishmania spp. dentro de las vacuolas de los macrófagos (llamados cuerpos de Leishan-Donovan) o aislados en los espacios intercelulares en la muestra examinada.*
- **Sugestiva:** *Se observan cambios inflamatorios, granulomatosis crónica, que sugieren la infección, pero no la confirma por la ausencia del parásito en la preparación examinada.*
- **Negativo:** *No se observan amastigotes de Leishmania spp. en la muestra examinada, ni cambios compatibles con reacción granulomatosa crónica*

1.3. CULTIVO

El cultivo es una técnica parasitológica que se basa en la detección de formas promastigote de *Leishmania spp.* mediante el uso de medios de cultivo enriquecidos. Constituye una de las técnicas confirmatorias para el diagnóstico de la leishmaniasis, debido a que los amastigotes presentes en una lesión sospechosa se transforman en promastigotes y se multiplican en el medio de cultivo, lo que facilita su identificación.

La sensibilidad del método de cultivo es variable y depende de muchos factores, entre ellos:

- El tiempo de evolución de la lesión.
- El estado de la lesión al momento de realizar la toma de muestra, siendo ideal proceder sobre una lesión limpia y sin infección.
- La habilidad del personal de laboratorio para elegir el sitio de la lesión con mayor actividad parasitaria y para desarrollar las técnicas de laboratorio.
- La selección del medio de cultivo a utilizar puede ser: 1) medios de cultivo bifásicos son más populares para el diagnóstico y aislamiento, de los que citaremos al NNN (*Novy, Nicolle y McNeal*), Senekjie, USMARU, Tobie sangre de conejo al 15%, Medio Evans modificado, Torrico-Solano-Torrico-Bermudes, etc.; 2) medios de cultivo líquidos por ejemplo, Schneider Drosophila Medium, Grace Insect Medium, M-199, RPMI-1640, etc.

Bioseguridad

Con la finalidad de proteger al operador como la contaminación de materiales y medios de cultivo es importante considerar las siguientes recomendaciones:

- Considerar toda muestra como potencialmente infecciosa.
- Utilizar equipo de protección individual: mandil, gorro, barbijo, lentes de protección y guantes descartables.
- Evitar la generación de aerosoles.
- Manipular y descartar el material cortopunzante siguiendo normas de bioseguridad.
- Manipular, descartar los materiales y reactivos siguiendo normas de bioseguridad.
- Mantener limpio el área de trabajo.
- En caso de contaminación, realizar inmediatamente la descontaminación de las áreas afectadas con alcohol etílico al 70% o hipoclorito de sodio al 0,5%.
- Manipular y transportar las muestras siguiendo normas de bioseguridad.

Toma de muestra por aspirado de lesión

La técnica es por aspiración del borde de la lesión cutánea o de la región inflamada de la lesión mucocutánea (**IMAGEN 9**). De igual forma que en la toma de muestra para EPD, el operador deberá evaluar cuidadosamente las lesiones y localizar un sitio donde aparentemente haya mayor actividad parasitaria, resguardando la salud del paciente.

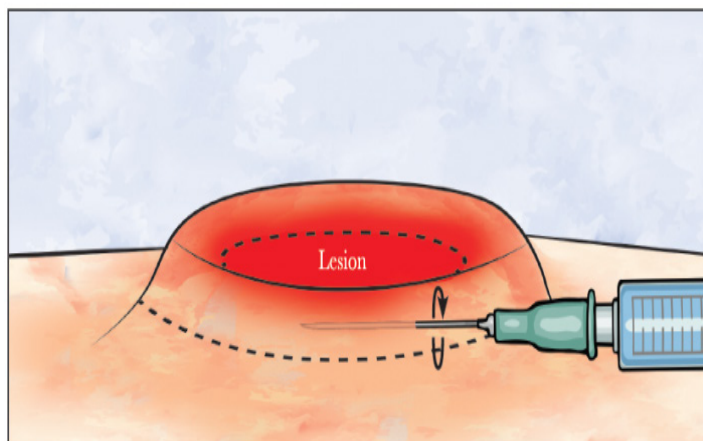


IMAGEN 9. ASPIRADO DE BORDE DE LA LESIÓN CUTÁNEA

Fuente: CDC – 2015.

Consideraciones previas

- El paciente no debe haber recibido tratamiento específico para leishmaniasis, un mes antes de la toma de muestra (inhibe la meta ciclogénesis y la multiplicación del parásito).
- El médico debe recomendar al paciente el lavado de las lesiones con agua y jabón antes de acudir al laboratorio.
- Puede procederse a la desinfección cubriendo la lesión con una gasa empapada con solución fisiológica con antibiótico gentamicina 150uL/mL, por 5 a 10 minutos.

Materiales, reactivos e insumos

- Gasas estériles (de diferentes tamaños).
- Solución fisiológica (0.85% de NaCl).
- Alcohol etílico al 70%.
- Marcador indeleble (para vidrio).
- Jeringa estéril de 3 mL con aguja 23Gx1½ cargada con 0,5 a 1 mL de solución fisiológica estéril (0.85% de NaCl) (por lesión).
- Tampón de solución salina de fosfatos (PBS, Phosphate buffer saline) con antibiótico a una concentración total de penicilina de 100 U/mL y estreptomina de 100 µg/mL o gentamicina de 100 µg/mL.
- Tela adhesiva microporosa.
- Cuaderno de registro de laboratorio.
- Ficha epidemiológica.

Procedimiento

- Explicar al paciente sobre el procedimiento, las limitaciones de la técnica, sobre el tiempo de entrega de los resultados y aclarar sus dudas.
- Solicitar la aceptación del consentimiento informado al paciente.
- Registrar los datos del paciente en el cuaderno de registro de laboratorio.
- Realizar la limpieza del área de trabajo con alcohol etílico al 70% y preparar el material necesario para la toma de muestra.
- Lavarse las manos y colocarse los guantes descartables.
- Cargar una jeringa de 3 mL con 0,5 a 1 mL de solución fisiológica con antibiótico a una concentración total de penicilina de 100 U/mL y estreptomicina de 100 µg/mL o gentamicina de 100 µg/mL;
- Rotular la jeringa con el código del paciente, la fecha en la que se toma la muestra y las iniciales del nombre completo del paciente;
- Observar la lesión y elegir el sitio de mayor actividad para la toma de muestra.
- La lesión debe estar limpia, libre de infección y otras sustancias;
- Proceder a la desinfección, con gasa estéril empapada con solución fisiológica estéril o solución de antibióticos, haciendo movimientos circulares del centro hacia la periferia de la lesión;
- Realizar la punción con la jeringa debajo de la piel, en la región de la lesión seleccionada, moviendo repetidamente la aguja hacia adelante y hacia atrás, girando o rotando simultáneamente la jeringa 5 veces.
- Aspirar el exudado de la lesión, aplicando succión suave, de 3 a 5 tiempos, hasta que el líquido del tejido se observe en el cono de la aguja.
- Retirar la jeringa de la lesión, tapar cuidadosamente con la técnica de una mano.
- Al finalizar la toma de muestra, hacer presión en la lesión con una gasa estéril hasta controlar el sangrado.
- Dependiendo del tipo de lesión, de ser posible, cubrir con una gasa estéril y tela adhesiva microporosa, recomendando al paciente mantener la herida limpia y cubierta, y no utilizar tratamientos empíricos para intentar sanar o cicatrizar la lesión.
- Transportar la muestra al laboratorio para el sembrado de inmediato.

Nota. -

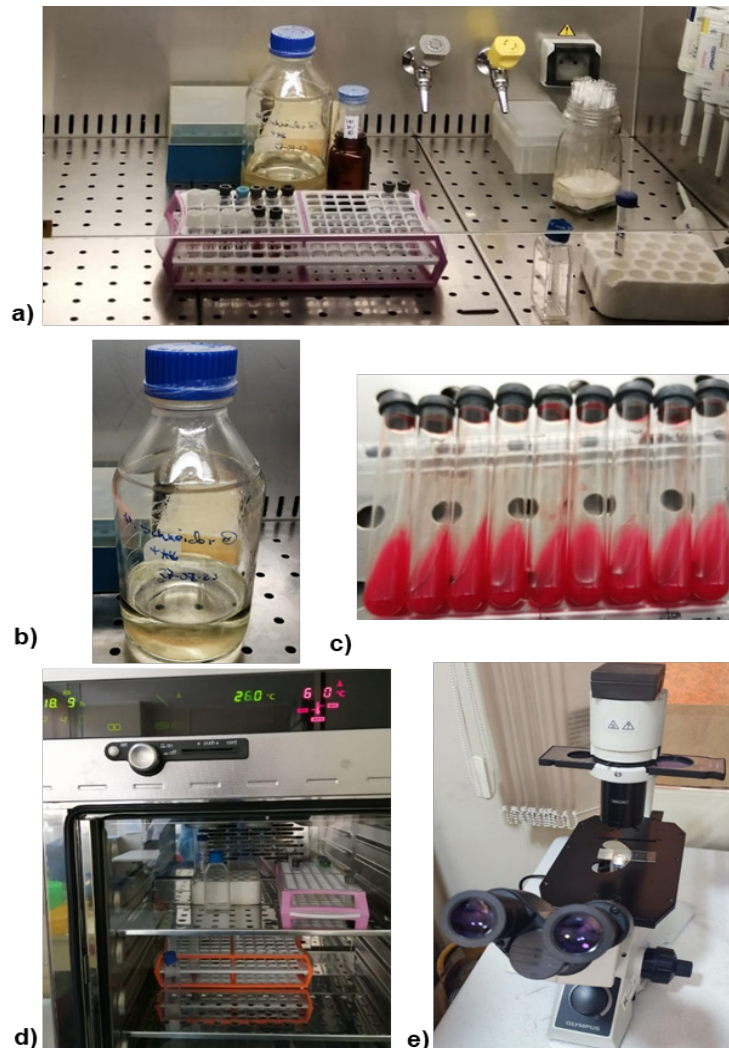
- En caso de múltiples lesiones escoger la que tenga menor tiempo de evolución. De acuerdo con el caso, puede ser necesario tomar muestras de más de una lesión.
- En caso de que la lesión tenga costra, humedecer con solución fisiológica y retirarla cuidadosamente. Hacer nuevamente la limpieza de la lesión.
- En caso de que existiera una sobreinfección bacteriana realizar una limpieza profunda o de ser posible solicitar al médico tratamiento con antibióticos y volver a citar al paciente para la toma de muestra posterior a la conclusión del tratamiento.

Materiales, reactivos e insumos

- Gradilla para tubos vacutainer.
- Marcador indeleble (para vidrio).
- Medio de cultivo bifásico.
- Estufa de incubación (26°C).
- Cabina de flujo laminar (Bioseguridad tipo IIA).

Procedimiento

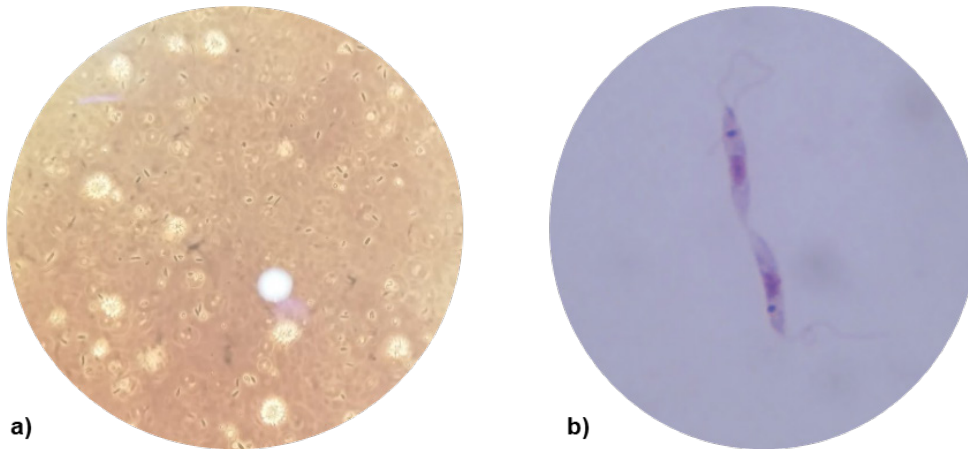
- En la cabina de flujo laminar, previamente irradiada, retirar la tapa de las jeringas y trasvasar 0.3 mL de aspirado en 2 tubos, con medio de cultivo bifásico. Rotular la fecha, código e iniciales del paciente.
- Incubar los tubos en la estufa a 26°C.
- Realizar el control periódico de los cultivos (cada 48 a 72 horas), observando al microscopio.



FOTOGRAFIA 11. MANEJO DE PARÁSITOS EN CULTIVO IN-VITRO DE *Leishmania* spp.:

a) Cabina de flujo laminar, b) y c) Medio de cultivo bifásico (Schneider-NNN), e) Incubación y mantenimiento de aislados en cultivo in-vitro a 26 °C, e) Control del cultivo en microscopio invertido.

Fuente: Fotografías Laboratorio de Parasitología - Entomología INLASA, 2023.



FOTOGRAFIA 12. CULTIVO IN-VITRO DE *Leishmania* spp.

- a) Cultivo masivo con formación de rosetas de promastigotes, observación en microscopio invertido (aumento 40x);
 b) Promastigotes de *Leishmania* spp. en cultivo, tinción Giemsa (aumento 100x).

Fuente: Fotografías Laboratorio de Parasitología - Entomología INLASA, 2023.

Lectura

Materiales, reactivos e insumos

- Estufa de incubación (26°C)
- Microscopio
- Cuaderno de registro de laboratorio

Procedimiento

- Revisar el crecimiento, buscando formas promastigote de *Leishmania* spp., periódicamente (al menos cada 72 horas hasta 3 semanas post cultivo), observando al microscopio con los objetivos de 20X o 40X.
- Interpretación de resultados:
 - **Resultado positivo:** Cuando se ha observado 1 o más formas promastigote de *Leishmania* spp. en los cultivos de la muestra examinada.
 - **Resultado negativo:** Cuando no se ha observado formas promastigote de *Leishmania* spp. en ninguno de los cultivos de la muestra examinada. El crecimiento debe ser monitoreado hasta los 21 días (3 semanas) antes de considerar los cultivos negativos.

Reporte de resultados

Los resultados son reportados en cuanto el cultivo sea detectado positivo. Registrar los resultados en el cuaderno de registro de laboratorio y reportar como sigue:

- **Positivo:** Se observan formas promastigote de *Leishmania* spp. en la muestra examinada.
- **Negativo:** No se observan formas promastigote de *Leishmania* spp. en la muestra examinada.
- Un resultado negativo no descarta la enfermedad.

1.4. PRUEBAS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos detectan el material genético del microorganismo de interés, existiendo en la actualidad una diversidad de pruebas que pueden ser aplicadas para el diagnóstico de laboratorio. En ese entendido el laboratorio podrá aplicar procedimientos validados de extracción y detección de material genético dependiendo las posibilidades técnicas e instrumentales. En tanto en este manual describiremos la técnica convencional de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El diagnóstico molecular se realizará mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La PCR es una herramienta molecular que presenta una especificidad del 100% y sensibilidad mayor al 90%, además permite identificar el género, caracterizar los complejos y especie de *Leishmania* a partir de muestras biológicas.

Diferentes blancos de amplificación han sido utilizados. Sin embargo, los que presentan mayor sensibilidad, son los que se encuentra en secuencias multicopias, como el gen de la subunidad pequeña ribosomal (SSU rRNA), secuencias repetitivas del DNA genómico, secuencias de los minicírculos de DNA del kinetoplasto (kDNA), el gen del locus gp63, que han sido utilizados no solo para la detección, sino también para la identificación de especies de Leishmania. La especificidad puede ser adaptada según la necesidad, a regiones específicas ya sean conservadas o variables como blanco. En casos donde se requiera la tipificación de cepas de Leishmania spp., se aplicará la técnica del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y/o secuenciación.

Bioseguridad

Con la finalidad de proteger al operador y la contaminación de materiales es importante considerar las siguientes recomendaciones:

- Considerar toda muestra como potencialmente infecciosa.
- Utilizar equipo de protección individual: mandil, gorro, barbijo, lentes de protección y guantes de nitrilo descartables.
- Evitar la generación de aerosoles.
- Manipular y descartar el manejo de material cortopunzante siguiendo normas de bioseguridad.
- Manipular y descartar los materiales y reactivos siguiendo normas de bioseguridad.
- Mantener limpia el área de trabajo.
- En caso de contaminación, realizar inmediatamente la descontaminación de las áreas afectadas con alcohol etílico al 70%.
- Manipular y transportar las muestras siguiendo normas de bioseguridad.
- **NOTA.** Para el envío de muestras al laboratorio de referencia ver apartado: Referencia de muestras.

Toma de muestra por aspirado de lesión

Para las pruebas moleculares se realizará el aspirado de lesión con jeringa hipodérmica (de acuerdo con el procedimiento descrito en la toma de muestra para cultivo).

Extracción de material genético

Materiales, insumos y equipos

- Tubos de microcentrifuga de 1.5 mL.
- Vortex.
- Estufa.
- Extractor de ácidos nucleicos.
- Termobloque para PCR.
- Centrifugadora con rotor hasta 14000 rpm.
- Micropipetas de 10 µL hasta 1000 µL.
- Gradillas para tubos de microcentrifuga de 1.5 mL.

Reactivos

- Kit comercial de extracción de ADN (para tejidos y sangre).
- Etanol absoluto.
- Agua tridestilada.

Procedimiento

La extracción del material genético es realizada a partir de la muestra de aspirado de lesión utilizando el kit comercial y de acuerdo con el protocolo del fabricante.



IMAGEN 10. ESQUEMA GENERAL DE LA EXTRACCIÓN DE ADN USANDO KIT COMERCIAL POR COLUMNA.

Fuente: Laboratorio CIGMO – INLASA, 2016.

Desarrollo de la PCR

Material biológico

- Muestras de ADN extraídas de lesiones con sospecha de leishmaniasis.

Materiales, insumos y equipos

- Cabina de PCR libre de ADN/ARN.
- Micropipetas de 10, 100 y 1000 µL.

- Tubos de microcentrifuga de 1.5 mL.
- Tubos de PCR estériles de 0.2 mL.
- Puntas para micropipeta con filtro de 10, 100 y 1000 µL.
- Termociclador.

Reactivos

- Agua tridestilada.
- Set Taq polimerasa (Buffer y solución de cloruro de magnesio).
- Deoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).
- Primers o cebadores específicos (oligonucleótidos)

18-S-F 5'-CCAAAG TGT GGA GAT CGA AG-3'

18-S-R 5'-GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG-3'

Procedimiento

- Preparar la campana de PCR con el material completamente estéril y libre de ADN/ARN. (Guantes de nitrilo, micropipetas, puntas con filtro, tubos de microcentrifuga, tubos de PCR y los reactivos necesarios).
- En un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 mL (o dependiendo del volumen de la mezcla a utilizar) realizar la preparación del Máster mix de acuerdo con las condiciones descritas en la **TABLA 3.**

TABLA 3. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

| | CONCENTRACIÓN INICIAL | CONCENTRACIÓN FINAL | VOLUMEN POR TUBO (µL) |
|----------------|----------------------------|---------------------|-----------------------|
| Agua ultrapura | | | 10.35 |
| Buffer/Cl2 Mg | 10X /15mM | 1X /2.5 mM | 5 |
| dNTP's | 10 mM | 0.2 mM | 0.5 |
| Primer 1 | 10 µM | 0.8 µM | 1 |
| Primer 2 | 10 µM | 0.8 µM | 1 |
| Taq polimerasa | 5 U/µL | | 0.15 |
| | <i>Master mix por tubo</i> | | 18 µL |
| | Muestra de ADN | | 7 µL |
| | Volumen de reacción | | 25 µL |

Fuente: INLASA - Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores – 2024.

- Distribuir el Master mix en tubos de PCR (0.2 mL).
- Adicionar el volumen requerido de ADN (7 µL).
- Tapar bien los tubos para evitar la evaporación durante la amplificación.
- Llevar los tubos de PCR al termociclador e iniciar la reacción.
- Una vez terminada la amplificación retirar los tubos de la máquina y llevarlas a 4°C hasta la corrida electroforética.

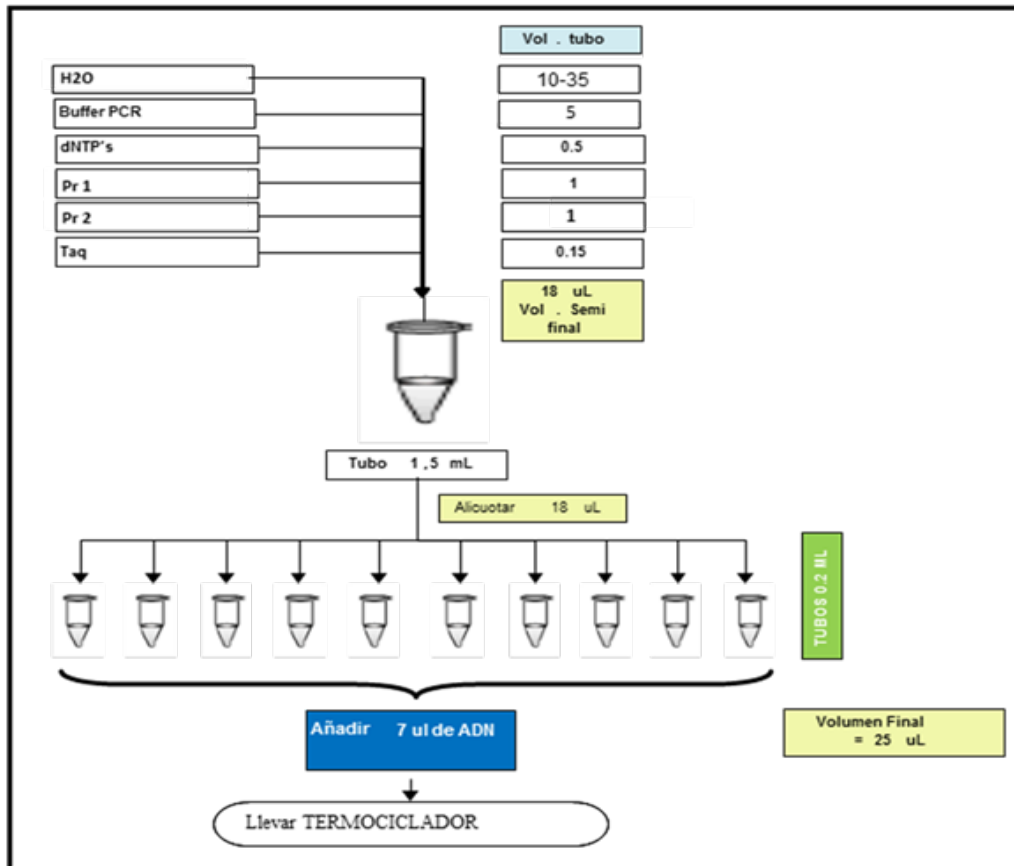


IMAGEN 11. PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE ADN POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Fuente: Manual de normas y procedimientos técnico operativos de laboratorio para la leishmaniasis – 2017.

Corrida electroforética

Materiales, insumos y equipos

- Microondas.
- Matraz de 250 mL.
- Balanza de precisión.
- Espátula.
- Papel aluminio.
- Pipeta automática.
- Pipeta de vidrio de 10 mL.
- Probeta de 100 y 1000 mL.
- Cámara de corrida electroforética horizontal.
- Micropipetas de 10 y 100 µL.
- Puntas de 10 y 100 µL.
- Transiluminador de luz UV.
- Cámara fotográfica.

Reactivos

- Agua destilada.
- Buffer TAE (Tris-Ácido acético-EDTA) 1X y TAE 0.5X.
- Agarosa.
- Colorante fluorescente de ADN no mutagénico (Ez-Vision).
- Marcador de peso molecular (1000 – 100 pb).

Procedimiento

- Preparar el gel de agarosa en solución TAE 1X.
- Esperar a que gelifique completamente.
- Colocar el gel en una cámara electroforética que contenga buffer TAE 0.5X, sumergiéndolo completamente.
- Cargar las muestras mezcladas en cada pozo del gel.
- Realizar la corrida electroforética a 50 o 100 voltios.
- Al finalizar la corrida llevar el gel a un transiluminador de luz UV para su observación.
- Fotografiar el gel para conservar un registro del mismo.



IMAGEN 12. CORRIDA ELECTROFORÉTICA EN GEL DE AGAROSA

Fuente: Manual de normas y procedimientos técnico operativos de laboratorio para la Leishmaniasis – 2017.

Reporte de resultados

Registrar los resultados en el cuaderno de registro de laboratorio y reportar como sigue:

- **Positivo:** Se detecta la presencia de ADN de *Leishmania spp.* en la muestra examinada.
- **Negativo:** No se detecta la presencia de ADN de *Leishmania spp.* en la muestra examinada.
- Un resultado negativo no descarta la enfermedad.

2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL

2.1. PRUEBA RÁPIDA INMUNOCROMATOGRÁFICA

La prueba es un inmunoensayo cualitativo para la detección de anticuerpos específicos contra la proteína recombinante k39 (proteína rK39), anticuerpos específicos contra *L. donovani* y *L. Infantum*. Durante la prueba, la muestra migra cromatográficamente sobre una membrana para reaccionar con el antígeno recombinante generando una línea roja a causa de la interacción específica antígeno-anticuerpo.

Bioseguridad

Con la finalidad de proteger al operador y la contaminación de materiales es importante considerar las siguientes recomendaciones:

- Considerar toda muestra como potencialmente infecciosa.
- Utilizar equipo de protección individual: mandil, gorro, barbijo, lentes de protección y guantes de nitrilo descartables.
- Evitar la generación de aerosoles.
- Manipular y descartar el manejo de material cortopunzante siguiendo normas de bioseguridad.
- Manipular y descartar los materiales y reactivos siguiendo normas de bioseguridad.
- Mantener limpia el área de trabajo.
- En caso de contaminación, realizar inmediatamente la descontaminación de las áreas afectadas con alcohol etílico al 70% o hipoclorito de sodio al 1%.
- Manipular y transportar las muestras siguiendo normas de bioseguridad.

Materiales, insumos y equipos

- Kit de detección de rK39.
- Jeringa de 3 mL.
- Torundas de algodón con y sin alcohol etílico 70%.
- Micropipeta graduable
- Tubos vacutainer
- Tubos de micro centrifuga de 1,5 mL.

- Gradillas
- Cronómetro
- Centrifuga para tubos de hemolisis.
- Centrifuga para tubos de micro centrifuga.
- Cuaderno de laboratorio.
- Ficha epidemiológica.

Muestra

Utilizar muestras de suero sanguíneo libre de hemolisis y lipemia obtenido en ayunas, la conservación es hasta las 72 horas refrigeradas de 2 a 8 grados centígrados, de no ser procesadas en ese tiempo las muestras deben ser conservadas a menos 20 grados centígrados hasta el momento del procesamiento.

Procedimiento

- Realizar la toma de muestra de sangre total y separar el suero por centrifugación.
- Retirar la tira reactiva de su envase primario (bolsa de aluminio).
- Colocar la tira reactiva horizontalmente sobre una superficie.
- Agregar 20 μ L de la muestra de suero sobre el área de sembrado.
- Levantar la tira y colocar en un micropocillo que contenga 2-3 gotas (150 μ L) del buffer proporcionado por el kit.
- Lea los resultados en 10 minutos sobre fondo blanco. Los resultados interpretados después de 10 minutos pueden ser erróneos.
- La presencia de esta línea roja frente a una línea control indica un resultado positivo (dos bandas), mientras que su ausencia indica un resultado negativo (una sola banda).
- **NOTA.** Revisar cada inserto y proceder según recomendaciones del fabricante.

Reporte de resultados

Registrar los resultados en el cuaderno de registro de laboratorio y reportar como sigue:

- **Positivo:** Se detecta la presencia de anticuerpos anti-rK39 de *Leishmania spp.* en la muestra examinada.
- **Negativo:** No se detecta la presencia de anticuerpos anti-rK39 de *Leishmania spp.* en la muestra examinada.
- Un resultado negativo no descarta la enfermedad.
- **Invalido:** No se evidencia ninguna banda en la zona de control de la prueba realizada (repetir la prueba).

3. REFERENCIA DE MUESTRAS

Referir las muestras al laboratorio de complejidad mayor en casos de difícil determinación del diagnóstico como ser en:

- Pacientes clínica y epidemiológicamente compatibles con leishmaniasis cutánea y/o mucocutánea con diagnóstico directo (EPD y cultivo) negativo.
- Pacientes clínica y epidemiológicamente compatibles con leishmaniasis visceral con diagnóstico indirecto (prueba rK39) negativo.
- Para todos los casos, la muestra a remitir debe cumplir con los requisitos indicados en el presente manual.

PARTE V

SISTEMA DE CONTROL DE CALIDAD DEL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS

Es un conjunto de actividades destinado a mejorar las competencias técnico-operativas de los profesionales de la red nacional de diagnóstico de las leishmaniasis. Permite reducir errores humanos, errores técnico-procedimentales y documentales, para garantizar resultados confiables y oportunos mediante procedimientos estandarizados y normatizados. Además, pretende certificar las competencias y el desempeño de los responsables del diagnóstico de leishmaniasis. Este conjunto de actividades está dirigido también a reducir errores, garantizar la reproducibilidad y repetibilidad de los procesos y procedimientos que conducen a la emisión de resultados confiables. Comprende:

- Supervisión directa e indirecta
- Evaluación y certificación de rendimiento a través de los Programas de Control de Calidad:
 - Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED)
 - Programa de Control de Calidad Interno (PCCI)

1. SUPERVISIÓN

1.1. SUPERVISIÓN DIRECTA

En la supervisión directa, el responsable del control estará en contacto con el personal del laboratorio a ser supervisado. Se realiza a través de visitas o durante periodos más largos si ambos trabajan en el mismo lugar. De modo que el supervisor pueda observar el desempeño del trabajo, con la finalidad de verificar, validar, mejorar, suministrar materiales y realizar recomendaciones. Este tipo de supervisión difícilmente se puede llevar a cabo de forma regular y puede resultar costosa. Además, requiere de mucho tiempo y disponibilidad de recursos humanos. No obstante, es importante para la evaluación de múltiples factores que no pueden ser evaluados con la supervisión indirecta, tales como el estado de los equipos, la calidad de almacenamiento de materiales y reactivos, el registro y la base de datos de los pacientes atendidos.

En general las desviaciones que pueden identificarse a partir de la supervisión directa son:

- Ejecución de procedimientos inadecuados en la toma y preparación de muestras.
- Ejecución de procedimientos inadecuados en la fijación y tinción de láminas.
- Falta de mantenimiento preventivo y calibración de equipos.
- Fallas en el adecuado uso y almacenamiento de los reactivos e insumos.
- Desempeño técnico del analista.
- Imprecisiones en la transcripción.
- Mala interpretación de los resultados.

1.2. SUPERVISIÓN INDIRECTA

La supervisión indirecta implica la evaluación a distancia del trabajo del personal a través de datos y otras informaciones presentadas periódicamente. Esta actividad permite medir el desempeño de todos los responsables de diagnóstico directo de la leishmaniasis, que además incluye al supervisor. Con este sistema, los supervisores pueden evaluar la calidad de las láminas con improntas, la tinción y los resultados de los exámenes, a partir de láminas remitidas al laboratorio de referencia correspondiente. Por su importancia, la supervisión es la estrategia más efectiva para garantizar la aplicación de las normas de calidad en la red nacional de laboratorios para el diagnóstico de las leishmaniasis.

2. PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD PARA EL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO DE LEISHMANIASIS

2.1. METODOLOGÍA DEL PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DE DESEMPEÑO (PEED)

El Programa de Evaluación Externa del Desempeño para el Diagnóstico Microscópico de Leishmaniasis, es un programa sistematizado de comparación entre los laboratorios, el cual es objetivo y periódico, tiene la finalidad de evaluar el desempeño de los responsables del diagnóstico microscópico de la leishmaniasis en relación a las competencias y destrezas, basado en el cotejo de los resultados de paneles de láminas estandarizadas, organizadas y elaboradas por una instancia superior dentro de la red nacional de laboratorios.

Declaración de confidencialidad

El Programa de Evaluación Externa del Desempeño para el Diagnóstico Microscópico de Leishmaniasis, declara que los resultados e información obtenida en la evaluación de cada uno de los participantes, es confidencial y solo serán entregados a cada participante. Sin embargo; estos pueden ser dados a conocer como resultados no personalizados en informes, publicaciones técnicas y también a entidades u organismos especializados de salud a nivel nacional, para fines pertinentes y según corresponda, lo anterior se informará con debida antelación a cada participante, el programa le asignará un código aleatorio; el cual es el medio de identificación para que realice el seguimiento en los reportes de resultados y en los informes generales emitidos por el Laboratorio de Referencia Nacional.

Documentación

Se tendrán disponibles para cada uno de los participantes la siguiente documentación:

- **INSTRUCTIVO:** Emitido por el componente de leishmaniasis del PNETV. Donde se describirá el funcionamiento del programa, métodos estadísticos, ítems de ensayo, manejo de ítems de ensayo, características de envío, resultados y evaluación del programa.
- **INFORME DE EVALUACIÓN:** Desempeño del laboratorio en la ronda respectiva.

Periodicidad y envío

Se realiza una vez al año, cumpliendo las normas de bioseguridad (triple empaque) y es responsabilidad del Laboratorio Nacional de Referencia de la Leishmaniasis en coordinación con el

Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores. En caso de extravió de los paneles de evaluación se deberá notificar inmediatamente y de ser necesario deberá repetirse la evaluación. El PEED también podrá ser realizado de forma directa “in situ” durante las actividades de visita o supervisión de los laboratorios de la red, cumpliendo los criterios metodológicos que se señalan.

Lectura de láminas

Deberá realizarse en las mismas condiciones que realiza el diagnóstico de rutina y no deberá tener condiciones especiales. Los niveles evaluados deberán llenar los formularios de registros de resultados según instructivo, los cuales deberán ser remitidos a nivel central. El plazo límite para presentación de resultados, que no será mayor a un mes después de recibido el material para el PEED.

Ítem de ensayo

Los ítems de ensayo disponibles para el ejercicio interlaboratorio constan de una matriz de material obtenido a través de raspado de lesión por el método de EPD, coloreadas con Giemsa al 10% (dilución 1/10). Se enviarán diez láminas, homogéneas y estables, procesadas de acuerdo con los procedimientos estandarizados, identificadas individualmente con códigos únicos, entre láminas positivas de diferente carga parasitaria y negativas. Los grupos de paneles deben ser uniformes, de forma que la evaluación permita comparar resultados. El parámetro por determinar en los ítems de ensayo es la identificación morfológica de las formas amastigotes intra o extracelulares de *Leishmania spp.*, con todas sus características.

Unidades consideradas, valor asignado

Las variables evaluadas en este programa son cualitativas, de tal forma que el valor asignado de cada ítem de ensayo es POSITIVO o NEGATIVO de formas amastigotes de *Leishmania spp.*, en la muestra examinada.

Métodos de evaluación

Para la metodología estadística para el Programa de Evaluación Externa del Desempeño para el Diagnóstico Microscópico de Leishmaniasis de concordancia entre laboratorios, se utilizará una medida de concordancia para variable cualitativa nominal (POSITIVO/NEGATIVO), el Índice Kappa de Cohen (k), el cual compara el desempeño del participante, frente al valor asignado del ítem de ensayo, corrigiendo la concordancia debida al azar y evidenciando la concordancia real, mediante la siguiente expresión matemática:

$$k = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Dónde: P_o es la proporción de concordancia observada (en tanto por 1) y P_e es la proporción de concordancia esperada por simple azar. El índice Kappa se interpreta bajo la **TABLA 4**.

TABLA 4. GRADO DE CONCORDANCIA DE ACUERDO A VALOR DEL ÍNDICE KAPPA.

| VALOR DE K | GRADO DE CONCORDANCIA (ACUERDO) |
|-------------|---------------------------------|
| < 0 | SIN ACUERDO |
| ≤0 - 0,20 | POBRE |
| 0,21 - 0,40 | DÉBIL |
| 0,41 - 0,60 | MODERADO |
| 0,61 - 0,80 | BUENO |
| 0,81 - 1,00 | MUY BUENO |

Fuente: Instituto Nacional de Colombia 2016.

2.2. METODOLOGÍA DEL CONTROL DE CALIDAD INTERNO (CCI)

El Control de Calidad Interno, está dirigido a evaluar la capacidad individual de los responsables regionales del diagnóstico directo de la leishmaniasis, en el procesamiento de las improntas que realizan rutinariamente. La metodología se basa en la proporción de acuerdos o desacuerdos existentes entre los resultados de la primera lectura del laboratorio evaluado y los resultados de la segunda lectura efectuada por el laboratorio evaluador.

Selección de muestras

La selección de muestras tiene las siguientes características:

- El CCI se realizará en toda la red de laboratorios de diagnóstico directo de la leishmaniasis y debe ser efectuada desde el nivel superior al nivel inferior.
- La evaluación se llevará a cabo trimestralmente por lo que el laboratorio evaluado deberá enviar al laboratorio evaluador, el 100% de las muestras obtenidas en los tres meses correspondientes al periodo de evaluación, junto a la base de datos del cuaderno de registro de laboratorio para leishmaniasis correspondiente. Además, se deberá informar la metodología utilizada en el procesamiento de las muestras reportadas.
- Las láminas no deben ser marcadas como positivas o negativas.
- Se seleccionarán 10 láminas con improntas como máximo por cada mes del trimestre evaluado.
- En el laboratorio evaluador, una persona que no participe del CCI seleccionará de forma aleatoria 5 láminas con improntas positivas de baja densidad parasitaria y 5 láminas con improntas negativas del 100% de láminas procesadas mensualmente.
- En el caso de laboratorios con producción mensual menores a 5 láminas con improntas positivas y/o 5 láminas con improntas negativas, se realizará el control del 100% de éstas.
- Metodológicamente, el evaluador externo deberá ser más riguroso en la revisión de láminas con improntas positivas o negativas en aquellos laboratorios donde no se analicen grandes cantidades de láminas con improntas de pacientes con sospecha de leishmaniasis.
- Los resultados del CCI deben ser registrados en el Formulario de Control de Calidad Interno (ANEXO 4).

Además de la evaluación de la capacidad diagnóstica de los responsables regionales de diagnóstico directo de la leishmaniasis, el CCI valora la calidad técnica del procesamiento de las láminas con improntas de pacientes con sospecha de leishmaniasis, de acuerdo a los siguientes criterios:

Calidad macroscópica de la lámina con impronta

Es un examen macroscópico de cada lámina con improntas seleccionadas para el control de calidad interno, en el que se evalúa los siguientes parámetros:

- Ubicación de la impronta (3 por lámina).
- Tamaño de las improntas.
- Grosor de las improntas.
- Identificación y rotulo de la lámina.

Una buena lámina con impronta debe tener las siguientes características:

- A simple observación, las 3 improntas deben ubicarse uniformemente en la lámina
- Deben medir entre 8 a 10 mm de diámetro.
- A simple vista el grosor debe ser homogéneo con fondo claro y d) la identificación deberá tener código asignado, la fecha y las iniciales del nombre completo del paciente.

Calidad microscópica de la impronta

Es un examen microscópico de cada impronta de aquellas láminas seleccionadas para el control de calidad interno, en el que se evalúa los siguientes parámetros:

- Calidad de la coloración.
- Calidad de la fijación.
- Presencia o ausencia de precipitados y/o artefactos
- Densidad y morfología de las células
- Contaminación excesiva por hongos y/o bacterias
- Excesiva presencia de glóbulos rojos
- Excesiva presencia de hilos de fibrina

Una buena impronta deberá tener las siguientes características: a) La coloración del núcleo y kinetoplasto del parásito deberá ser azul-violeta intenso, citoplasma transparente azulado, membrana definida de color violeta. b) un buen fijado no deberá presentar desprendimiento ni desgaste celular, c) No deberá observarse presencia de artefactos o precipitados del colorante, d) no deberá existir superposición de tejidos y/o células ni abundantes glóbulos rojos y e) la limpieza de la lesión debe evitar la presencia de hongos y/o bacterias.

Análisis de los resultados

Todos los criterios descritos en el punto anterior serán calificados según las características que presenten las láminas con improntas positivas o negativas evaluadas. La calificación asignada en el proceso será:

- 2 puntos = óptimo
- 1 punto = regular
- 0 puntos = deficiente

Análisis de los resultados de la calidad diagnóstica

Primero se debe cotejar los resultados de las lecturas del laboratorio evaluado versus los del laboratorio evaluador y clasificarlos de acuerdo a los siguientes criterios:

- **Número de láminas verdadero-positivas:** Muestras positivas reportadas en los registros como positivas.
- **Número de láminas falso-positivas:** Muestras negativas reportadas en los registros como positivas.
- **Número de láminas falso-negativas:** Muestras positivas reportadas en los registros como negativas.
- **Número de láminas verdadero-negativas:** Muestras negativas reportadas en los registros como negativas.

Posteriormente se debe calcular y registrar los resultados de la sensibilidad y de especificidad aplicando las siguientes formulas:

- **SENSIBILIDAD:**

$$(\text{Verdadero Positivas} / \text{Verdadero Positivas} + \text{Falso Negativas}) \times 100 =$$

- **ESPECIFICIDAD:**

$$(\text{Verdadero negativas} / \text{Verdadero Negativas} + \text{Falso Positivas}) \times 100 =$$

Análisis de los resultados de la calidad técnica

El análisis de resultados con criterios evaluados sobre la calidad técnica del procesamiento de las láminas con improntas, serán realizadas de acuerdo al siguiente cálculo:

- **Calificación obtenida:** Sumatoria total de la calificación obtenida en cada casilla.
- **Calificación esperada:** Número de casillas llenadas o calificadas x 2.
- **Porcentaje:** (calificación obtenida / calificación esperada) x 100.

PARTE VI

SEGUIMIENTO Y MONITOREO

Una vez aprobado el **“MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS OPERATIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS LEISHMANIASIS”**, este deberá ser socializado a los tres niveles del estado: nacional, departamental y municipal.

Posteriormente se debe llevar a cabo el seguimiento al cumplimiento de las normas y los procedimientos descritos en el presente manual, a través de actividades de evaluación y monitoreo a los laboratorios de diagnóstico en sus cuatro niveles, mismos que permitirán identificar los avances y resultados de la aplicación del presente documento.

El Programa Nacional de Enfermedades Transmitidas por Vectores, en su componente leishmaniasis, será encargado de liderar este proceso de monitoreo y la evaluación bajo un cronograma de trabajo.

- *Capacitación anual* =
$$\frac{\text{Número de analistas capacitados}}{\text{Número de capacitaciones}}$$

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Torrico MC, Fernández-Arévalo A, Ballart C, Solano M, Rojas E, Abras A, Gonzales F, Arnau A, Tebar S, Llovet T, Lozano D, Ariza-Vioque E, Gascón J, Picado A, Torrico F, Muñoz C, Gállego M. - Usefulness of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in the Characterization of Leishmania Strains Causing Tegumentary Leishmaniasis in Bolivia versus hsp70 Gene Sequencing. *Microbiol Spectr.* 2023 Feb 14;11(1):e0347722. doi: 10.1128/spectrum.03477-22.
2. Leishmaniasis [Internet]. Paho.org. [citado el 31 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis>
3. Andrade YMF de S. Investigaçãõ da síntese de eicosanoides durante a leishmaniose: uma análise do parasito ao hospedeiro. 2022.
4. CDC. About [Internet]. Leishmaniasis. 2024 [citado el 31 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/leishmaniasis/about/index.html>
5. Garcia XM, Gutierrez CM, Mendoza LCM. Características epidemiológicas de la Leishmania- [Internet]. Org.bo. [citado el 31 de julio de 2024]. Disponible en: <http://www.scielo.org.bo/pdf/rccm/v14n2/a03.pdf>
6. Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS). Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM). Guía: “Programa integrado de capacitación en diagnóstico parasitológico y molecular de la leishmaniasis tegumentaria para las Américas”. 2015
7. Ministerio de Salud. Terrazas R., Callisaya A.M. - Manual de normas y procedimientos técnico operativos de laboratorio para la leishmaniasis (436), primera edición, La Paz Bolivia - 2017.
8. Manual de procedimientos para la vigilancia y el control de las leishmaniasis en la Región de las Américas [Internet]. Organización Panamericana de la Salud; 2023. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/57740/9789275327340_spa.pdf?sequence=5&isAllowed=y
9. Torrico, M. C., Parrado Vargas, R., Garcia Orellana, A. L., & Solano Mercado, M. A. Manual de normas y procedimientos técnicos de laboratorio para Leishmaniasis. Ministerio de Salud y Deportes; 2010.
10. Milner D, Pecora N, Solomon I, Soong T: Infectious Diseases. Primera Edición. Philadelphia: ELSILVER, 2015.
11. Procop G, Pritt B: Pathology of Infectious Diseases. Primera Edición. Philadelphia: ELSILVER, 2015.
12. Abadías-Granado I, Diago A, Cerro PA, Palma-Ruiz, Gilaberte Y. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *ACTAS Dermo - Sifiliográficas.* 2021.
13. Ministerio de Salud. Norma Nacional de Procedimientos Técnicos de Leishmaniasis (364). Fernández G., primera edición, La Paz Bolivia - 2015.

ANEXOS

ANEXO 2



DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA
PROGRAMA NACIONAL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES
(LEISHMANIASIS)

REPORTE DE RESULTADO DE LABORATORIO

CÓDIGO DE PACIENTE:
NOMBRES Y APELLIDOS:
EDAD:
RESIDENCIA ACTUAL:
MÉDICO SOLICITANTE:
INSTITUCIÓN SOLICITANTE:
TIPO DE LESIÓN:
TIPO DE MUESTRA ANALIZADA:
FECHA DE RECEPCIÓN:
FECHA ENTREGA RESULTADOS:
OBSERVACIONES:

| INFORME DE RESULTADOS | |
|-------------------------------------|---|
| MÉTODO DE DIAGNÓSTICO | RESULTADO |
| EXAMEN PARASITOLÓGICO DIRECTO (EPD) | POSITIVO. Se observan formas de amastigote de leishmania spp. en la muestra examinada |

COMENTARIOS:

*Un resultado negativo no descarta la enfermedad
Método estándar para el diagnóstico de la leishmaniasis*

Interpretación del examen de acuerdo a:

*Manual de procedimientos técnicos operativos para el diagnóstico de laboratorio de leishmaniasis (2024).
Serie: Documentos Técnico Normativos - Ministerio de Salud y Deportes - Bolivia.
Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en la Américas 2023 (OPS/OMS).*

(ANVERSO)

**DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA
PROGRAMA NACIONAL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES
(LEISHMANIASIS)**

REPORTE DE RESULTADOS

| PRUEBA | RESULTADO | |
|--------------------------------------|--|---|
| | POSITIVO | NEGATIVO |
| EXAMEN PARASITOLÓGICO DIRECTO | Se observan formas amastigote de <i>Leishmania</i> spp. en la muestra examinada | No se observan formas amastigote de <i>Leishmania</i> spp. en la muestra examinada |
| CULTIVO | Se observan formas promastigote de <i>Leishmania</i> spp. en la muestra examinada. | No se observan formas promastigote de <i>Leishmania</i> spp. en la muestra examinada. |
| BIOLOGÍA MOLECULAR | Se detecta la presencia de ADN de <i>Leishmania</i> spp. en la muestra examinada. | No se detecta la presencia de ADN de <i>Leishmania</i> spp. en la muestra examinada. |
| PRUEBA RÁPIDA RK-39 | Se detecta presencia de anticuerpos anti-rK39 de <i>Leishmania</i> spp. en la muestra examinada. | No se detecta presencia de anticuerpos anti-rK39 de <i>Leishmania</i> spp. en la muestra examinada. |

(REVERSO)

ANEXO 3



**DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA
PROGRAMA NACIONAL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES
(LEISHMANIASIS)**

| CONDICIONES DE DERIVACIÓN DE MUESTRAS | | | |
|---------------------------------------|--|--|---|
| MUESTRA | VOLÚMEN | CANTIDAD | EMPAQUE |
| <i>Aspirado de lesión</i> | <i>1 mL</i> | <i>2 tubos eppendorf (aspirado por duplicado)</i> | <i>Triple empaque, cadena de frio (-20°C)</i> |
| <i>Biopsia</i> | <i>Muestra representativa (bajo criterio médico) en solución fisiológica</i> | <i>La cantidad de muestras que considere el médico</i> | <i>Triple empaque, cadena de frio (-20°C)</i> |

| CONDICIONES DE DERIVACIÓN DE MUESTRAS DE ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA (LEISHMANIASIS VISCERAL) | | | |
|--|-----------------|---|---|
| MUESTRA | VOLÚMEN | CANTIDAD | ENVIO |
| <i>Extendido de aspirado de médula ósea (realizar antes de trasvasar al tubo con EDTA)</i> | - | <i>2 a 3 láminas, en portaláminas</i> | <i>Triple empaque</i> |
| <i>Aspirado de médula ósea (procedimiento realizado por el médico)</i> | <i>2 a 3 mL</i> | <i>1 tubo tapa morada (EDTA)</i> | <i>Triple empaque, cadena de frio (-20°C)</i> |

PARA LA PRESTACION DE SERVICIOS SE DEBE INCLUIR LOS SIGUIENTES DOCUMENTOS:

Orden medica Formulario D8 – SUS

Solicitud de exámenes de laboratorio (boleta SUS) debidamente llenado (datos completos del paciente, fecha de solicitud vigente, exámenes solicitados, firma y sello del médico, sello del hospital o centro de salud).

Ficha epidemiológica debidamente llenada.

ANEXO 4



DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA PROGRAMA NACIONAL DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES (LEISHMANIASIS)

CONTROL DE CALIDAD INDIRECTO

I- DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL LABORATORIO EVALUADO

| | | | |
|--------------|-------------------------------------|--|----------------------|
| DEPARTAMENTO | NOMBRES Y APELLIDOS DEL RESPONSABLE | | |
| MUNICIPIO | TOTAL DE MUESTRAS ENVIADAS | | FECHA DE RECEPCIÓN |
| INSTITUCIÓN | PERIODO | | LABORATORIO EVALUADO |

II- RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO

| N° | CÓDIGO LÁMINA | REGISTRO PARA EL LABORATORIO EVALUADO | | REGISTRO PARA EL EVALUADOR DEL CCI | | | | | | | | | | | | |
|----|---------------|---------------------------------------|--|------------------------------------|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| | | RESULTADO CUALITATIVO | | CCI MACROSCÓPICO | | | | CCI MICROSCÓPICO | | | | | | | | |
| | | | | UDI | TDI | GDI | IRL | CDC | CDF | PAP | DMC | CHB | PDF | | | |
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | |

III- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

| INDICADORES ESTADÍSTICOS | |
|---|--|
| a. NÚMERO DE LÁMINAS VERDADEROS POSITIVOS | |
| b. NÚMERO DE LÁMINAS FALSOS POSITIVOS | |
| c. NÚMERO DE LÁMINAS FALSOS NEGATIVOS | |
| d. NÚMERO DE LÁMINAS VERDADEROS NEGATIVOS | |
| e. SENSIBILIDAD | |
| f. ESPECIFICIDAD | |

| RESULTADOS CUALITATIVO | CCI MACROSCÓPICO | | | | CCI MICROSCÓPICO | | | | | | |
|------------------------|------------------|-----|-----|-----|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | UDI | TDI | GDI | IRL | CDC | CDF | PAP | DMC | CHB | PDF | |
| ESPERADA | | | | | | | | | | | |
| OBTENIDA | | | | | | | | | | | |
| PORCENTAJE | | | | | | | | | | | |

RESPONSABLE EVALUADOR

RESPONSABLE DEL LABORATORIO

(ANVERSO)

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PARA UN CORRECTO LLENADO DEL FORMULARIO DE CONTROL DE CALIDAD INDIRECTO

UDI = Ubicación de la impronta (3 por lámina)
 TDI = Tamaño de las improntas
 GDI = Grosor de las improntas
 IRL = Identificación y rotulo de la lámina
 CDC = Calidad de la coloración
 CDF = Calidad de la fijación
 PAP = Presencia o ausencia de precipitados
 DMC = Densidad y morfología de las células
 CHB = Contaminación por hongos y/o bacterias
 PDF = Presencia de fibrina

Parámetros para la calificación:

Todos los criterios descritos en el punto anterior serán calificados según las características que presenten las láminas con improntas positivas o negativas evaluadas. La calificación asignada en el proceso será:

2 puntos = óptimo
 1 punto = regular
 0 puntos = deficiente

Análisis de los resultados de la calidad diagnóstica.

Primero se debe cotejar los resultados de las lecturas del laboratorio evaluado versus los del laboratorio evaluador y clasificarlos de acuerdo a los siguientes criterios:

Número de láminas verdaderos-positivas: Muestras positivas reportadas en los registros como positivas.

Número de láminas falsos-positivas: Muestras negativas reportadas en los registros como positivas.

Número de láminas falsos-negativas: Muestras positivas reportadas en los registros como negativas.

Numero de láminas verdaderos-negativas: Muestras negativas reportadas en los registros como negativas.

Posteriormente se debe calcular y registrar los resultados de la sensibilidad y de especificidad aplicando las siguientes formulas:

Sensibilidad: $(\text{Verdadero Positivas} / \text{Verdadero Positivas} + \text{Falso Negativas}) \times 100 =$
 Especificidad: $(\text{Verdadero Negativas} / \text{Verdadero Negativas} + \text{Falso Positivas}) \times 100 =$

Análisis de los resultados de la calidad técnica.

El análisis de los resultados de los criterios evaluados sobre la Calidad técnica del procesamiento de las láminas con improntas será realizado de acuerdo al siguiente cálculo:

Calificación obtenida: Sumatoria total de la calificación obtenida en cada casilla

Calificación esperada: Número de casillas llenadas o calificadas x 2

Porcentaje: $(\text{Calificación Obtenida} / \text{Calificación Esperada}) \times 100$

(REVERSO)

ANEXO 5



INSUMOS, DISPOSITIVOS MÉDICOS Y REACTIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS POR EXAMEN PARASITOLÓGICO DIRECTO (EPD)

REFERENCIAL

| PROCEDIMIENTO | INSUMOS, DISPOSITIVOS MÉDICOS Y REACTIVOS | UNIDAD DE MEDIDA | CÁLCULO DE INSUMOS POR NÚMERO DE PACIENTES | | | | | |
|----------------------|---|------------------|--|--------------|--------------|---------------|---------------|----------------|
| | | | 1 PACIENTE | 25 PACIENTES | 50 PACIENTES | 100 PACIENTES | 500 PACIENTES | 1000 PACIENTES |
| TOMA DE MUESTRA | Guantes de látex descartables | Unidad | 2 | 50 | 100 | 200 | 1000 | 2000 |
| | Gasa doble | Unidad | 4 | 100 | 200 | 400 | 2000 | 4000 |
| | Tela adhesiva | Centímetro | 12 | 300 | 600 | 1200 | 6000 | 12000 |
| | Alcohol etílico 70% | Mililitro | 4 | 100 | 200 | 400 | 2000 | 4000 |
| | Solución fisiológica | Mililitro | 4 | 100 | 200 | 400 | 2000 | 4000 |
| | Baja lenguas | Unidad | 1 | 25 | 50 | 100 | 500 | 1000 |
| | Crema antibiótica | Gramos | 2 | 50 | 100 | 200 | 1000 | 2000 |
| | Bisturí N° 15 | Unidad | 1 | 25 | 50 | 100 | 500 | 1000 |
| | Lámina porta objeto esmerilado | Unidad | 2 | 50 | 100 | 200 | 1000 | 2000 |
| TINCIÓN DE IMPRONTAS | Alcohol etílico 96% | Mililitro | 6 | 150 | 300 | 600 | 3000 | 6000 |
| | Agua destilada | Mililitro | 6,7 | 167,5 | 335 | 670 | 3350 | 6700 |
| | Giemsa solución madre | Mililitro | 0,7 | 16,5 | 33 | 66 | 330 | 660 |
| | Aceite de inmersión | Mililitro | 0,5 | 12,5 | 25 | 50 | 250 | 500 |
| | Pipeta Pasteur plástica | Unidad | 1 por cada 50 muestras | | | 2 | 10 | 20 |

- Determinar la cantidad de pacientes atendidos en un determinado periodo según reportes (trimestral, semestral o anual).
Ejemplo: Se tiene que un total de 82000 pacientes que fueron atendidos en la última gestión a nivel nacional.
- Determinar el factor de crecimiento (10%) a partir de la cantidad de pacientes atendidos en un periodo determinado.

$$\text{Factor de crecimiento (pacientes)} = (\text{Cantidad de pacientes atendidos en un periodo} \times 10\%) / 100\%$$

Ejemplo:

$$\text{Factor de crecimiento (pacientes)} = (82000 \times 10\%) / 100\% = 8200 \text{ pacientes}$$

- Determinar la cantidad de pacientes que se pretenden atender en un determinado periodo (trimestral, semestral o anual).

$$\text{Cantidad de pacientes que se pretenden atender} = \text{Cantidad de pacientes atendidos en un periodo anterior comparable} + \text{Factor de crecimiento}$$

Ejemplo:

$$\text{Cantidad de pacientes que se pretenden atender en el año} = 82000 + 8200 = 90200 \text{ pacientes}$$

- Determinar la cantidad de insumo, dispositivo y/o reactivo necesario para un periodo determinado.

$$\text{Cantidad de insumo, dispositivo médico o reactivo requerido para un periodo (mL/g/mg/unidad/cm)} = \frac{\text{Cantidad de pacientes que se pretenden atender en el periodo} \times \text{Cantidad estándar requerida por paciente}}{\text{Factor de crecimiento}}$$

Ejemplo: Si se quiere calcularla cantidad de colorante Giemsa requerida para un año

$$\text{Cantidad de Giemsa requerido (mL)} = 90200 \times 0,7 \text{ mL} = 63140 \text{ mL}$$

- Determinar el factor pérdida (20%) del insumo, dispositivo y/o reactivo necesario para un periodo determinado.

$$\text{Factor pérdida (mL/g/mg/unidad/cm)} = (\text{Cantidad requerida} \times 20\%) / 100\%$$

Ejemplo:

$$\text{Factor pérdida para Giemsa (mL)} = (63140 \text{ mL} \times 20\%) / 100\% = 12628 \text{ mL}$$

- Determinar el requerimiento total del insumo, dispositivo y/o reactivo necesario para un periodo determinado.

$$\text{Requerimiento total (mL/g/mg/unidad/cm)} = \text{Cantidad requerida} + \text{Factor pérdida}$$

Ejemplo:

$$\text{Requerimiento total para Giemsa (mL)} = 63140 \text{ mL} + 12628 \text{ mL} = 75768 \text{ mL}$$

$$\text{Requerimiento total para Giemsa (L)} = (75768 \text{ mL} \times 1\text{L}) / 1000\text{mL} = 75,8 \text{ L}$$

Entonces será necesario programar la compra de 75,8 litros de solución madre de Giemsa para atender 90200 pacientes en el año.

ANEXO 6



PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS REFERENCIAL

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA

Se necesitará:

- Una balanza analítica con una precisión de 0,01g
- Papel de filtro de 11cm de diámetro
- Un matraz erlenmeyer de vidrio de 1L
- Un vaso de precipitado de vidrio de 250 mL
- Espátulas (sirven los bajalenguas, fáciles de conseguir)
- 1L de agua destilada o desionizada
- Fosfato de potasio dihidrogenado (anhidro) (KH_2PO_4)
- Fosfato disódico hidrogenado (anhidro) (Na_2HPO_4).

Modo de preparación:

- Pesar 0.7g de KH_2PO_4 y trasvasar a un matraz erlenmeyer conteniendo 150mL de agua destilada aproximadamente, agitar hasta que se disuelva completamente
- Pesar 1 gramo de Na_2HPO_4 y añadir al matraz erlenmeyer, disolver completamente y añadir agua hasta enrasar a 1L
- Medir el pH y ajustar a 7.2 – 7.4 con HCl 0.1N o NaOH 0.1N.

MEDIO DE CULTIVO *MMN*

- Pesar 1.2g de NaCl, 2 g de Bacto Agar
- Añadir 200mL de H_2O destilada
- Esterilizar por autoclave durante 15 minutos
- Atemperar a 55°C y añadir 10 mL de sangre de conejo desfibrinado y mezclar suavemente por agitación
- Alicuotar a 1mL en tubos vacutainer estériles
- Dejar agarizar en pico de flauta,
- Almacenar a 4°C hasta su utilización no mayor a 30 días

MEDIO DE CULTIVO *SCHNEIDER*

- Mezclar 24.5 g de *Schneider's Insect Medium*, 0.4 g de NaHCO_3 , 4 g de HEPES, 100 mL de Suero Bovino Fetal descomplementado,
- 1g de Glutamina y 100 mg de Gentamicina
- Aforar a 1L con agua destilada
- Esterilizar por filtración con filtros millipore de 0.22 μm
- Conservar a 4°C hasta su utilización no mayor a 30 días

LÍQUIDO DE MARC ANDRÉ

- Agua destilada: 30 mL
- Hidrato de Cloral: 40 g
- Ácido acético 30 mL

Mezclar los reactivos en un frasco ámbar

ANEXO 7

GALERIA DE FOTOGRAFIAS

a) *Leishmaniasis mucosa*, b), c) y d) *Leishmaniasis cutánea*



a)



b)



c)



d)

Fuente: Hospital Municipal de La Asunta, Hospital Municipal de Caranavi.
Servicio de Salud Departamental - SEDES La Paz

Leishmaniasis cutánea



a)



b)

Fuente: Hospital Municipal de Villa Tunari.
Servicio de Salud Departamental - SEDES Cochabamba

GALERIA DE FOTOGRAFIAS

Leishmaniasis cutánea



a)



b)



c)



d)

*Fuente: Área de Laboratorio de Vectores.
Servicio de Salud Departamental - SEDES Potosí*

GALERIA DE FOTOGRAFIAS

Leishmaniasis cutánea



a)



b)



c)



a)



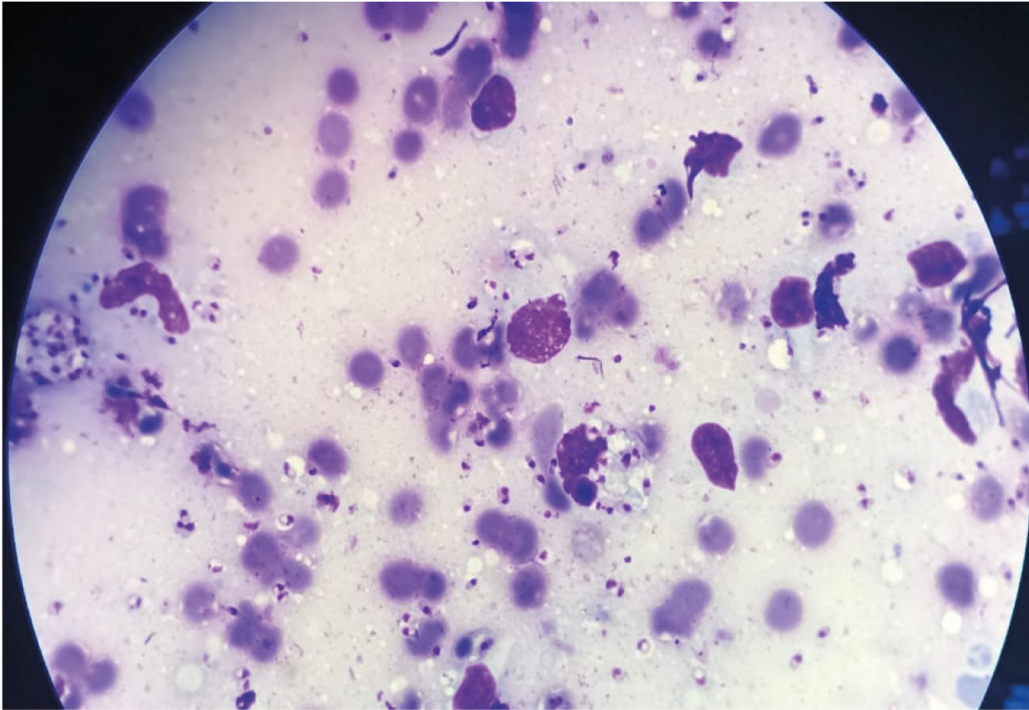
b)



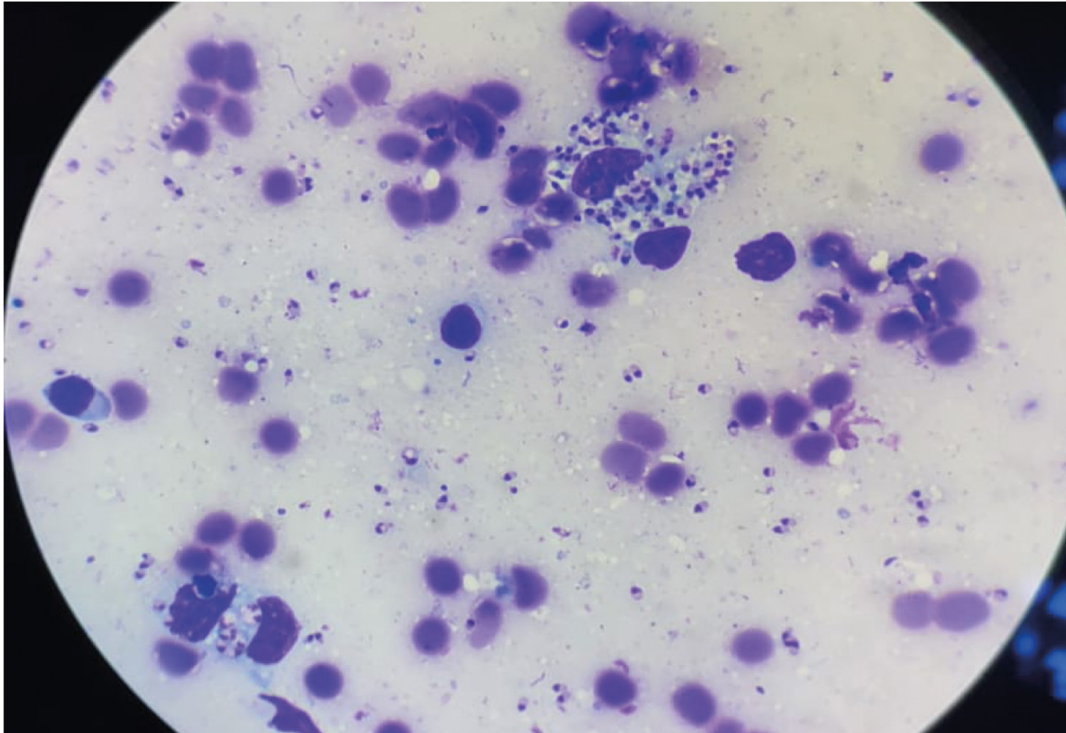
c)

Fuente: Centro de Salud Central - Red 01 – Trinidad.
Servicio de Salud Departamental - SEDES Beni

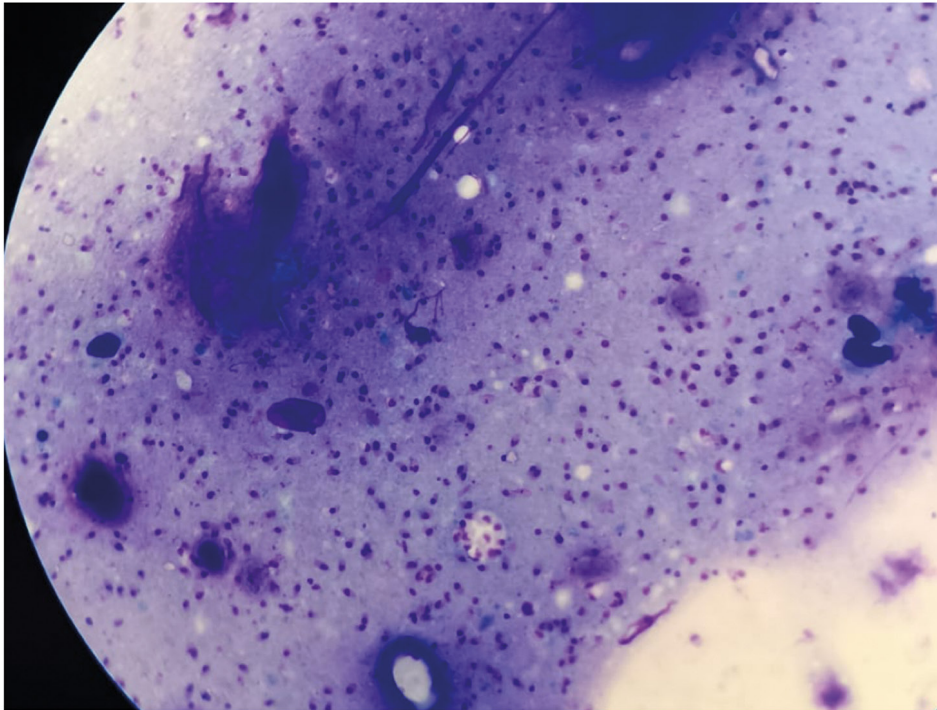
GALERIA DE FOTOGRAFIAS



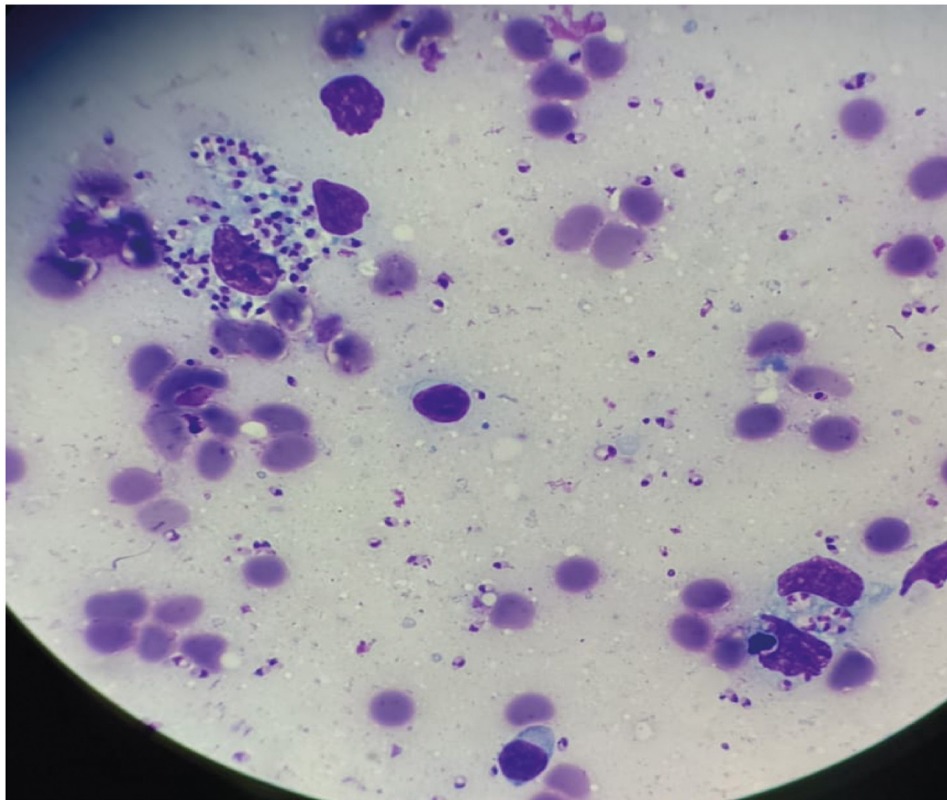
*Fuente: Hospital Entre Rios - Red de Salud IV - Ivirgarzama
Servicio de Salud Departamental - SEDES Cochabamba*



GALERIA DE FOTOGRAFIAS



*Fuente: Hospital Entre Rios - Red de Salud IV - Ivirgarzama
Servicio de Salud Departamental - SEDES Cochabamba*



ANEXO EDITORIAL

REUNIÓN NACIONAL DE VALIDACIÓN DEL DOCUMENTO

Reunión de validación Cochabamba, mayo 2024

PARTICIPANTES EN LA VALIDACIÓN DEL DOCUMENTO

| | |
|---|-------------------------------|
| Dra. Ana María Callisaya Ramos | CONSULTORA OPS/OMS |
| Dr. Pablo Estanislao Bilbao Ramos | INLASA |
| Dr. Juan Carlos Mollinedo Martínez | INLASA |
| Dra. Santa Lucia Ichazo Illescas | CENETROP |
| Dra. MSc. Nelly Carolina Feraudy Fournier | HOSPITAL DE CLINICAS - LA PAZ |
| Dra. Dina Condori Choque | PNVEEyE - MSyD |
| Lic. Patricia Calatayud Manriquez | MINISTERIO DE DEFENSA |
| Dr. Jaime Luis Huaynoca Villca | SEDES - LA PAZ |
| Dr. José Flores Ibáñez | SEDES - LA PAZ |
| Dra. Gabriela Eugenia Antonio Urquidi | SEDES - ORURO |
| Dra. Martha Mamani Vargas | SEDES - POTOSÍ |
| Dra. Ximena Roxana Gómez Paz | SEDES - COCHABAMBA |
| Dr. Alfredo Carvajal Bernal | SEDES - CHUQUISACA |
| Dr. Ferdy Javier Durán Flores | SEDES - SANTA CRUZ |
| Dra. Lidia De La Cruz Rivero | SEDES - TARIJA |
| Dra. Sebastia Nelly Aguado Aparicio | SEDES - TARIJA |
| Dra. Pauletty Alcira Avila Haibara | SEDES - BENI |
| Dr. Wilson Alex Calle Figueroa | SEDES - BENI |
| Dra. Lourdes Echalar Afcha | IBBA - UMSA |
| Dra. Maria Luz Soto Sánchez | SELADIS - UMSA |
| Dra. Mary Cruz Torrico Rojas | LABIMED - UMSS |
| Dra. Fabiola González Agreda | LABIMED - UMSS |

El presente documento contó con la cooperación técnica de la Organización Panamericana de la Salud, Oficina Bolivia.

