

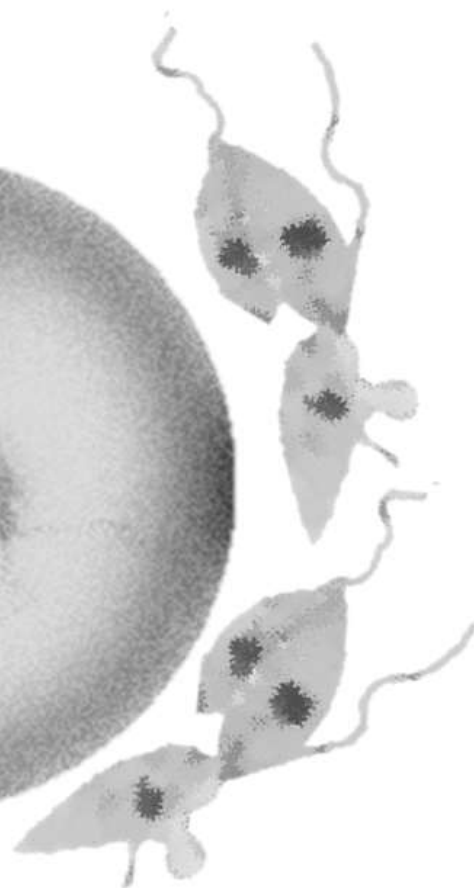
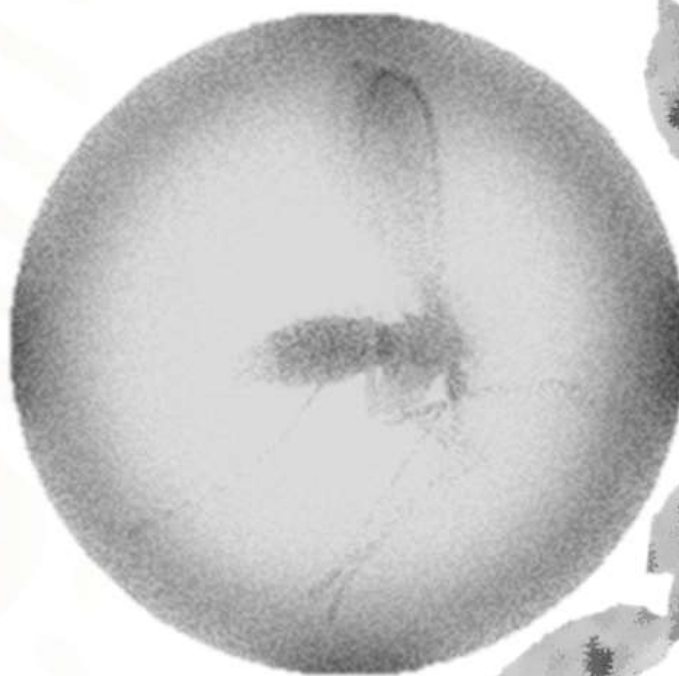


**SALUD**

SECRETARÍA DE SALUD

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

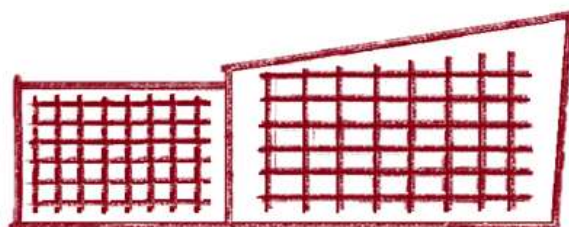
# Lineamientos para la Vigilancia por Laboratorio de la Leishmaniasis



Siendo Referencia Nacional en Salud Pública

**INDRE**

**InDRE**



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



# LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA LEISHMANIASIS

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

**2019**

PRIMERA EDICIÓN. 2019

INDRE

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

TODOS LOS DERECHOS RESERVADOS CONFORME A LA LEY

© INDRE-SECRETARÍA DE SALUD

SE PERMITE LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL SI SE CITA LA FUENTE: INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ”. LINEAMIENTOS PARA LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE LA LEISHMANIASIS, INDRE. MÉXICO: SECRETARÍA DE SALUD; 2019

COLECCIÓN PUBLICACIONES TÉCNICAS DEL INDRE

ISBN: EN PROCESO

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS “DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ” FRANCISCO P MIRANDA 177, COL. LOMAS DE PLATEROS, DEL. ÁLVARO OBREGÓN, C. P. 01480, MÉXICO, D. F. TEL. (55)50-62-16-00

LA EDICIÓN ESTUVO A CARGO DE: DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ

EL DISEÑO ESTUVO A CARGO DE: DR. JUAN FRANCISCO ROMÁN PEDROZA,

IMPRESO EN MÉXICO. *PRINTED IN MEXICO*

PARA DUDAS SOBRE EL CONTENIDO DE ESTE LINEAMIENTO PONERSE EN CONTACTO AL CORREO [juan.roman@salud.gob.mx](mailto:juan.roman@salud.gob.mx) Y CON EL COORDINADOR DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS A TRAVÉS DEL CORREO: [octavio.rivera@salud.gob.mx](mailto:octavio.rivera@salud.gob.mx) CON COPIA CON EL ASUNTO: *CONTENIDO DE LINEAMIENTOS LEISHMANIASIS*.

# SECRETARÍA DE SALUD

## **Dr. Jorge Alcocer Varela**

SECRETARIO DE SALUD

## **Dra. Asa Cristina Laurell**

SUBSECRETARIA DE INTEGRACIÓN Y DESARROLLO DEL SECTOR SALUD

## **Dr. Hugo López-Gatell Ramírez**

SUBSECRETARIO DE PREVENCIÓN Y PROMOCIÓN DE LA SALUD

## **Dr. José Luis Alomía Zegarra**

DIRECTOR GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA

INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICOS  
"DR. MANUEL MARTÍNEZ BÁEZ"  
INDRE

**Biól. Irma López Martínez**

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

**Mtra. Lucía Hernández Rivas**

DIRECTORA DE SERVICIOS Y APOYO TÉCNICO

**Lic. Adriana Castro Cabrera**

SUBDIRECTORA DE OPERACIÓN

**Biól. Norma Angélica Montes Colima**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BACTERIOLOGÍA

**Mtra. Dalia Viviana Vallejo Jauffred**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS

**Mtra. Judith Estévez Ramírez**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL DE MUESTRAS Y SERVICIOS

**Mtro. Hiram Olivera Díaz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES EMERGENTES Y URGENCIAS

**Dra. Clara Gorodezky Lauferman**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA

**Mtra. Mónica Salas García**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA

**Dra. Gabriela Meneses Ruiz**

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

## GRUPO DE TRABAJO

MTRO. OCTAVIO CÉSAR RIVERA HERNÁNDEZ

JEFE DEL LABORATORIO DE LEISHMANIA

COORDINADOR DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS

QFB. MA. DEL ROCÍO ROBLEDO CARREÓN

ESP. EN SC. RAFAEL ACATA LARA

QFB. CRISTHIAN GILBERTO ZÚÑIGA ORTEGA

TEC. BEATRIZ ORNELAS PÉREZ

QFB. LIDIA CRESCENCIO ROSALES

ADSCRITOS AL LABORATORIO DE LEISHMANIA

DR. JUAN CARLOS CARPIO PEDROZA

ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

DR. GABRIELA MENESES RUIZ

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

BIOL. IRMA LÓPEZ MARTÍNEZ

DIRECTORA DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA

DR. JOSÉ ALBERTO DÍAZ QUIÑÓNEZ





# CONTENIDO

CONTENIDO	9
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública	12
Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Leishmaniasis	13
MARCO LEGAL	14
DEFINICIONES OPERACIONALES	16
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS	18
ORGANIZACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS	19
FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS	19
Funciones de los Laboratorios del nivel local	19
Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública	20
Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia	24
TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA	25
Recolección y conservación de la muestra	26
Envío y transporte de la muestra	28
Criterios de aceptación y rechazo de muestras	28

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO	31
ESTÁNDARES DE CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO	35
PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO	37
CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS	39
BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE	40
BIBLIOGRAFÍA	42
15. ANEXOS	44
Anexo I: Bioseguridad en el laboratorio	44
Anexo II: Técnicas diagnósticas	45
Anexo III: Materiales y preparación de reactivos.	56
Anexo IV: Imágenes de Portada	57

# INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo perteneciente al género *Leishmania*, transmitida por un insecto vector (*Lutzomia*), conocido en algunas zonas del país como jején, papalotilla, palomilla, quemador. La enfermedad en el ser humano se presenta de 4 formas clínicas:

- Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL),
- Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LCD),
- Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) y
- Leishmaniasis Visceral (LV)

Esta última es la forma clínica más grave, se presenta en niños pequeños y personas con compromisos en el sistema inmunológico. Si no se trata a tiempo puede ser mortal.

La enfermedad es endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo y está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las Enfermedades Tropicales desatendidas. En México, la mayor prevalencia de casos corresponde a LCL y se presenta en el sureste del país, en los estados Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Yucatán, Quintana Roo y Campeche. Aunque de forma esporádica se han reportado casos esporádicos en estados de la zona norte como Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Hidalgo, San Luis Potosí y del Noroeste en Nayarit y Jalisco.

La LCD se ha reportado con menor frecuencia en los límites de los estados de Veracruz con Tabasco. La prevalencia para los casos de LMC es muy baja y se detectado en los estados de Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca. En cuanto a la LV existe una zona bien caracterizada, ubicada en la cuenca del río Balsas, entre los estados de Guerrero y Puebla, además de Oaxaca y Chiapas.

Las Leishmaniasis son parasitosis consideradas como zoonosis, donde pequeños mamíferos silvestres y cánidos domésticos son reservorios importantes para que las personas sean infectadas.

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SiNaVE), se apoya del Laboratorio de Leishmania del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) y al Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (RNLSP) para llevar a cabo las actividades para el diagnóstico, control de calidad y referencia de esta enfermedad de manera confiable y oportuna.

El presente documento establece los lineamientos de operación para la vigilancia basada en el laboratorio, incluyendo las funciones por niveles técnico

administrativos; la toma, manejo y envío de muestras; la metodología para el análisis de muestras, la evaluación del desempeño y los estándares de calidad.

## ANTECEDENTES

### Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

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

Es el soporte técnico-científico útil para la vigilancia epidemiológica, genera información de calidad para la toma oportuna de decisiones, a través de la confirmación mediante estudios de laboratorio en muestras biológicas.

La RNLSP está integrada por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE) como órgano rector de la red, los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) y los Laboratorios de Apoyo a la Vigilancia Epidemiológica (LAVE). Se encuentra estructurada en tres niveles: nacional, estatal y local o sus equivalentes para otras instituciones. El nivel nacional está representado por el InDRE como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR).

Tiene fundamento legal en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica y se encuentra definida en los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente “Vigilancia Epidemiológica”.

El diagnóstico de la Leishmaniasis es parte del Marco Analítico Básico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.

## Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Leishmaniasis

La Leishmaniasis cutánea fue descrita por vez primera en la Península de Yucatán por Seidelin en 1912, quien la denominó “úlceras de los chicleros”. El primer estudio epidemiológico sobre la Leishmaniasis en México fue realizado en pacientes de los campamentos de chicleros de la península de Yucatán por Beltrán y Bustamante en el año de 1942 por el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET), hoy Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez” (InDRE). En 1950, se logró aislar el primer caso de Leishmaniasis visceral en México, que es la forma más grave de la enfermedad, conocida como Kala-azar.

En 1983 en el ISET se inició el estudio de tripanosomátidos (*Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp*) en México. Un año después se crearon los ceparios de *Leishmania spp* y *Trypanosoma cruzi*, así como el montaje de técnicas de diagnóstico serológico preparado con antígenos propios. En 1994, se creó el Laboratorio de Leishmania y la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) fue la primera en ser estandarizada como metodología de referencia para el diagnóstico de Leishmaniasis.

A partir del 2005 el laboratorio se incorpora al programa de Evaluación Externa del Desempeño para los Microscopistas de la Red de Parasitosis Transmitidas por Vector. El Laboratorio de Leishmania apoya a los programas de Vigilancia Epidemiológica a través de La RNLSP mediante un diagnóstico que se basa en el cuadro clínico y antecedentes de residencia o procedencia de áreas endémicas con transmisión de la enfermedad. El en la NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector se describe la “demostración directa al microscopio o por PCR” (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) e indirectamente por estudios inmunológicos.

Uno de los objetivos del Laboratorio de Leishmania como Laboratorio Nacional de Referencia para este diagnóstico en el InDRE, es la formación de recursos humanos, impartiendo anualmente un curso de “Actualización de Enfermedades Transmitidas por Vector y/o Curso en el Diagnóstico de la Leishmaniasis”, tanto para la RNLSP como para todo el sector salud. Así mismo, se imparten cursos dirigidos al personal técnico de la RNLSP sobre las diferentes técnicas diagnósticas que se encuentran implementadas en el InDRE. La vigilancia por laboratorio dentro del proceso de la vigilancia

epidemiológica es esencial para establecer el impacto de la enfermedad y evaluar los esfuerzos de control de la transmisión y detección de epidemias.

En enero del 2012 el Laboratorio de Leishmania se certifica bajo los requerimientos de la norma ISO 9001:2008. En diciembre del 2015 el laboratorio obtiene la acreditación bajo la norma ISO 15189:2012. En el año 2016 mantiene la acreditación bajo la norma NMX-EC-15189-IMNC-2015 Requisitos particulares para la calidad y la competencia de los laboratorios clínicos y la certificación bajo la Norma NMX-CC-9001-IMNC-2015 Sistema de Gestión de la Calidad – Requisitos.

## MARCO LEGAL

### Constitución de los Estados Unidos Mexicanos

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Artículo 4. Diario Oficial de la Federación 05/II/1917, Última Reforma D.O.F. 26/03/2019.

### Leyes

- Ley General de Salud, México. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 7 de febrero de 1984. Última reforma publicada DOF 24/12/2018.
- Ley Federal de Responsabilidades de los Servidores Públicos. D.O.F. 16/07/2016.
- Ley General del Sistema Nacional Anticorrupción; 18/07/2016.
- Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados. D.O.F. 26/01/2017.

### Reglamentos

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

### Normas Oficiales Mexicanas

- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica, D.O.F. 19/02/2013.

- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014, Para la vigilancia epidemiológica, promoción, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vectores. D.O.F. 01/06/2011.
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. D.O.F. 27/03/2012.
- Norma Oficial Mexicana NOM-035-SSA3-2012. En materia de información en salud.
- Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. D.O.F. 26/10/2012.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. D.O.F. 22/10/1993; Modificación D.O.F. 23/06/2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2015, Sistema armonizado para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo. D.O.F. 09/10/2015

## Lineamientos y Manuales

- Dirección General de Epidemiología. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector; DGAE. México: Secretaría de Salud; 2017.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez. Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2019.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para programas de evaluación externa del desempeño de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para la Gestión del Riesgo Biológico; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.
- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para el reconocimiento a la competencia técnica de los laboratorios que apoyan a la vigilancia epidemiológica; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2015.

- Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez”. Lineamientos para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico a la RNLSP, InDRE. México: Secretaría de Salud; InDRE. México: Secretaría de Salud; 2018.

## DEFINICIONES OPERACIONALES

Las definiciones operacionales de Leishmaniasis se encuentran descritas en la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2014 Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector y el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector emitido por la Dirección General de Epidemiología (DGE) con aprobación del Comité Nacional de vigilancia Epidemiológica (CONAVE) se describen a continuación:

- **Leishmaniasis:** la enfermedad zoonótica con afectaciones dérmicas cutáneas, mucocutaneas o visceral causada por protozoarios del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos de una persona infectada a una sana mediante la picadura de insectos hematófagos del género *Lutzomyia*.

Las definiciones de caso sospechoso y probable son las descritas en el Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Vector, actualmente vigente:

- **Caso sospechoso:** Toda persona con cuadro inespecífico de Leishmaniasis que refiera antecedentes de residencia o visita a zona endémica de este padecimiento.
- **Caso probable:** Todo caso sospechoso que presente alguno o varios de los siguientes signos y síntomas:
  - **Caso probable de Leishmania Cutánea Localizada (LCL):** aparición de una o más lesiones nodulares o úlceras de bordes indurados, fondo limpio e indoloro, o bien reacción positiva a la intradermorreacción (IDR).
  - **Caso probable de Leishmania Mucocutánea (LMC):** obstrucción o perforación de mucosas de nariz, boca y garganta.



- **Caso probable de Leishmania Visceral (LV):** presencia de fiebre irregular y prolongada, hepatoesplenomegalia indolora, linfadenopatía y pérdida de peso.
  - **Caso probable de Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD):** presencia de múltiples nódulos que se diseminan a lo largo de casi todo el cuerpo con anergia a la intradermorreacción (IDR).
- **Caso confirmado de Leishmaniasis:** Todo caso probable en el que se demuestre la presencia del parásito mediante pruebas parasitológicas y serológicas específicas reconocidas por el InDRE.
  - **Caso descartado:** Todo caso probable cuyo resultado de laboratorio no demuestre la presencia del parásito mediante pruebas parasitológicas y serológicas específicas reconocidas por el InDRE.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Dar a conocer a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Leishmaniasis, de forma clara y definida, los procesos estandarizados de diagnóstico por laboratorio, control de calidad y referencia de las muestras, para un diagnóstico oportuno y de calidad, que garantice la confiabilidad diagnóstica en la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública.

### Objetivos Específicos

- Garantizar la calidad en el diagnóstico de Leishmaniasis.
- Ser el documento guía para el soporte técnico-científico de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública para la Vigilancia de la Leishmaniasis.

### Ámbito de aplicación

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

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA  
PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS

El Laboratorio de Leishmania del InDRE, como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) a nivel federal, es responsable de la coordinación de la RNLSP siendo el órgano rector de la Red para el diagnóstico, referencia, capacitación, actualización y evaluación de la competencia técnica. En la siguiente figura se muestran los laboratorios integrantes de la Red de Leishmaniasis.



Figura 1. Conformación de la red para el diagnóstico de Leishmaniasis en México. En color vino los LESP que realizan el diagnóstico

## ORGANIZACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS

La RNLSP la encabeza el Laboratorio de Leishmania, adscrito al Departamento de Parasitología del InDRE y está integrada por los Laboratorios Estatales de Salud Pública (LESP) a través del componente Leishmania y los laboratorios de diagnóstico locales. (Figura 2.)

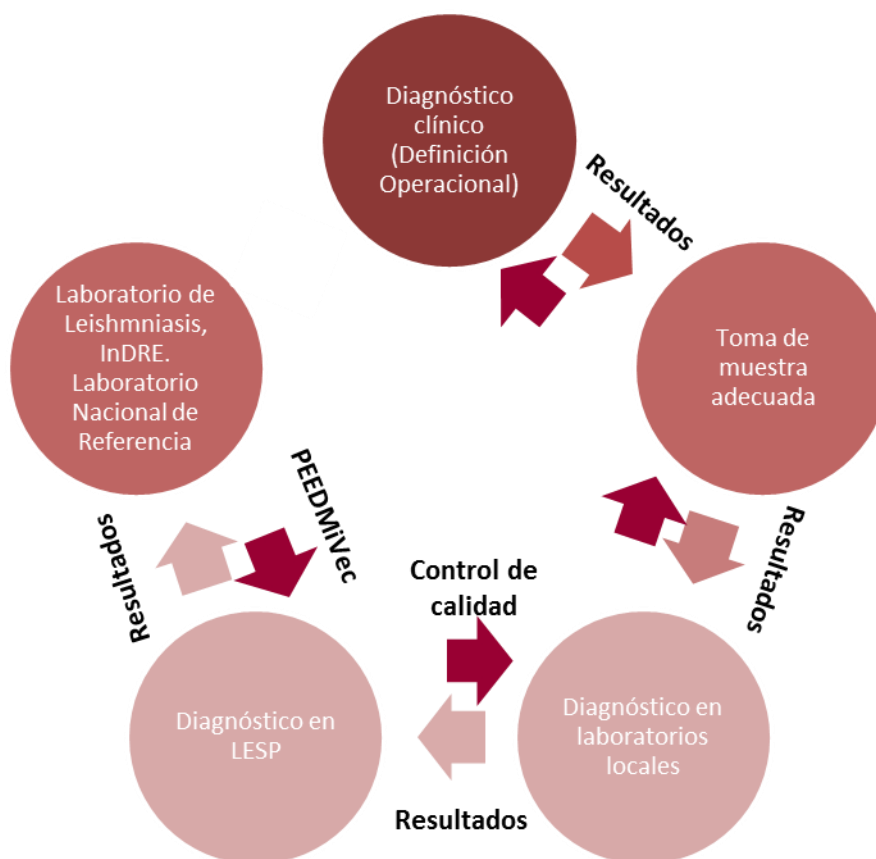


Figura 2. Flujo de trabajo de la Red Nacional de Laboratorios para el diagnóstico de enfermedades parasitarias transmitidas por vector.

## FUNCIONES DE LOS INTEGRANTES DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS

Funciones de los Laboratorios del nivel local

- Realizar la recepción e identificación de las muestras.
- Procesar las muestras de acuerdo a los procedimientos establecidos.
- Seleccionar de las muestras que se van a analizar de acuerdo a la prioridad del material biológico y número de muestras recibidas.
- Observar al microscopio las muestras de acuerdo a los procedimientos establecidos.
- Referir muestras al LESP de su entidad para control de calidad y para la realización de las pruebas generales y especializadas o de referencia que no realicen.
- Notificar al órgano normativo jurisdiccional correspondiente los casos de Leishmaniasis confirmados: LCL, LCD, LMC y LV.
- Recibir capacitación y asesoría del nivel estatal.
- Aplicar las recomendaciones del nivel estatal.
- Cumplir con el programa de control de calidad que establece el nivel estatal.

## Funciones de los Laboratorios Estatales de Salud Pública

### Para el diagnóstico

- Cumplir con lo que se establece en el presente documento
- Asegurar la calidad del diagnóstico en el Laboratorio de Leishmania.
- Emitir en tiempo y forma los resultados de los exámenes de laboratorio.
- Cumplir con el envío de muestras al InDRE para control de calidad y conformación del banco de láminas, sueros, cepas y DNA.
- En caso de duda diagnóstica enviar muestras para el servicio de referencia al InDRE.
- Generar evidencia y notificar al órgano normativo estatal correspondiente los casos confirmados.
- Participar como mecanismo de apoyo técnico, proporcionando la información relacionada y requerida por el programa sustantivo del área de su competencia.

### Para la evaluación del desempeño en la red estatal

- Evaluar que se lleven a cabo los procedimientos, métodos y técnicas estandarizadas.
- Seleccionar las muestras para control de calidad positiva y negativa del área de influencia del LESP.

- Compilar las muestras de las jurisdicciones y redes de apoyo y mantener registro de esta actividad.
- Reportar inmediatamente las incongruencias encontradas en el control de calidad (la re-observación).
- Establecer un plan de acción en caso de tener incongruencias e informar al InDRE de avances y conclusiones.
- LESP que tengan el diagnóstico liberado deberán de enviar solamente el 100 % de muestras positivas cada mes, para la conformación del banco de muestras, en caso de considerarlo necesario el InDRE le solicitará un porcentaje de las muestras negativas.

### Análisis de la información generada.

- Capacitar en los diferentes temas concernientes a Leishmaniasis en apoyo a la vigilancia epidemiológica, al personal de los laboratorios locales del programa y demás instituciones del Sector Salud que lo requieran (o se ha detectado que lo requieren a través del monitoreo del desempeño en el área de influencia).
- Recabar, analizar y evaluar la información sobre la prestación de servicios de diagnóstico de *Leishmania* de los laboratorios locales para el aseguramiento de la calidad de la red.
- Supervisar que no existan muestras de diagnóstico pendientes en los laboratorios.
- Supervisar el manejo del equipo asignado conforme a lo establecido en los documentos autorizados y manuales de operación correspondiente para el aseguramiento de la calidad en la red estatal.
- Proporcionar información relevante detectada en el laboratorio mediante informes, notas informativas y reportes de *Leishmania*, a la Dirección del LESP para que sea difundida a las instancias estatales correspondientes contribuyendo a la vigilancia epidemiológica estatal y nacional de manera confiable y oportuna.
- Dar respuesta a las solicitudes de exámenes de laboratorio de las enfermedades parasitarias ocasionadas por *Leishmania spp.*
- Emitir de manera oportuna la información relacionada con las actividades de apoyo a los programas sustantivos del área de su competencia.

- Elaborar propuestas para abordar las áreas de oportunidad sobre las necesidades técnicas y desarrollo de habilidades, para el fortalecimiento del marco analítico del laboratorio.
- Emitir en tiempo y forma los resultados de los exámenes de laboratorio.
- Desarrollar, evaluar e implementar técnicas de vanguardia para el diagnóstico de Leishmaniasis en apoyo a los programas sustantivos que le competen.
- Mantener el control de existencias de materiales y reactivos con los que se apoya a los laboratorios locales, para la oportuna respuesta de solicitud de insumos.
- Participar en la evaluación del desempeño de los LESP, a través del Boletín Caminando a la Excelencia.

#### Para el Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEEDMiVec)

- Aplicar el PEEDMiVec a los laboratorios locales de la red.
- Generar la evidencia de la evaluación para la red, enviar copia de resultados al microscopista y al InDRE.
- Organizar la información de estas actividades y proporcionarla cuando sea requerida por las instancias evaluadoras.
- En caso de discordancia, deberán elaborar un plan de acción (acciones de mejora y/o correctivas) que permitan asegurar un mejor desempeño en las subsecuentes evaluaciones. Este plan deberá enviarse al jefe del Laboratorio de Leishmania del InDRE, a más tardar 30 días hábiles después de recibir las calificaciones del PEEDMiVec. Dicho plan será planteado para el TOTAL del personal (microscopistas jurisdiccionales y estatales) y NO exime a las redes con calificación aprobatoria menor al 99%.
- Las evidencias de la atención a este plan de acción, deberá ser enviado al jefe del Laboratorio de Leishmania del InDRE antes del envío del siguiente PEEDMiVec.
- Los laboratorios que no cumplan con los requisitos anteriores, no podrán participar en el PEEDMiVec y su evaluación en el Boletín Caminando a la Excelencia (BCE) será cero.

#### Para la capacitación

- Organizar el curso anual de capacitación estatal a los laboratorios locales de acuerdo a las necesidades detectadas a través del PEEDMiVec o del monitoreo (Control de la Calidad).
- Mantener en niveles óptimos la capacidad diagnóstica de los integrantes de la red.
- Capacitar a los microscopistas en el manejo del equipo nuevo y las actualizaciones técnicas que emita el LNR.
- Brindar apoyo técnico a los elementos de la red que lo soliciten.
- Proporcionar el curso de inducción al puesto del personal de nuevo ingreso y generar evidencia.
- Notificar al InDRE (Laboratorio de Leishmania), vía oficial, cambios en el responsable del diagnóstico.
- De los puntos anteriores deberán generar y resguardar la evidencia probatoria para el momento que sea solicitada por el InDRE.

#### Para el apoyo técnico

- Participar en las urgencias epidemiológicas en el área de su competencia.
- El laboratorio podrá colaborar y/o elaborar trabajos de investigación operativa que proporcione información prioritaria estatal, una vez que los protocolos sean aceptados por los comités de investigación *ad hoc*.
- Apoyar con la preparación y/o evaluación de los reactivos que utilizan los integrantes de la red.
- Apoyar en la selección para la adquisición y en el suministro de materiales y reactivos requeridos por los laboratorios de la red estatal de acuerdo a la evaluación proporcionada por el InDRE.
- Participar en la elaboración y actualización de los manuales técnicos referentes a diagnóstico y temas especializados (bioseguridad, manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos, etc.) para uso en el ámbito estatal y local.
- Dar inducción al puesto al personal de nuevo ingreso (Instruirle y mostrar sus funciones).
- Capacitar al personal de nuevo ingreso.
- En caso de requerir apoyo para el servicio de diagnóstico, el laboratorio integrante de la RNLSP solicitará el mismo a la Dirección General Adjunta del InDRE con atención a la Dirección de Diagnóstico y

Referencia, misma que evaluará la petición y condiciones del apoyo de acuerdo a su capacidad.

## Funciones del Laboratorio Nacional de Referencia

El laboratorio de Leishmania, es el Laboratorio Nacional de Referencia para el diagnóstico de las diferentes formas clínicas de la Leishmaniasis y el órgano normativo para el diagnóstico. Las funciones del LNR que competen para el área de microscopía de la Red de Laboratorios son:

- Efectuar diagnóstico de la Leishmaniasis solo para los estados que no realicen o tengan dado de alta el diagnóstico de Leishmaniasis por microscopia en el Marco Analítico Básico.
- Consolidar algoritmos de referencia y criterios de interpretación de resultados.
- Realizar control de calidad en el diagnóstico parasitológico, apoyado a nivel estatal por los LESP. El control de calidad se realizará al 100% de las muestras biológicas positivas y al 10% de las negativas.
- Transmitir tecnología estandarizada a los laboratorios integrantes de la Red (Improntas o frotis, Inmunofluorescencia Indirecta, PCR).
- Ofertar material biológico como improntas y/o frotis y antígeno para IFI; para este último los LESP deberán mostrar que cuentan con infraestructura y capacitación, en conjunto con la supervisión y autorización del Laboratorio de Leishmania.
- Capacitar en servicio para la formación de recursos humanos en la prestación de un servicio eficiente.
- Implementar y adecuar nuevas técnicas de diagnóstico en apoyo al algoritmo de referencia.
- Realizar investigación y desarrollo tecnológico en apoyo a la vigilancia epidemiológica.
- Generar información de orden nacional para la toma de decisiones en el control de la enfermedad.
- En caso de que un laboratorio integrante de la RNLSP requiera apoyo para el servicio de diagnóstico, se evaluará la petición y condiciones del apoyo de acuerdo a la capacidad.

## Para el PEEDMiVec

- Seleccionar y caracterizar material del banco de improntas.



- Proporcionar el material caracterizado al laboratorio organizador del PEEDMiVec.
- Participar en el envío del material biológico a los LESP cuando así se requiera.
- Evaluar los resultados de los microscopistas participantes en el apartado de Leishmaniasis.
- Enviar al coordinador en turno los resultados para su integración al informe por estado.
- Revisar y rubricar los oficios en dónde se incluyen los resultados para Leishmania
- Dar seguimiento a las áreas de oportunidad detectadas en los microscopistas de cada red estatal.

#### Para capacitación

- Organizar el curso anual de capacitación a los LESP de acuerdo a las necesidades detectadas a través del PEED o del monitoreo.
- Mantener en niveles óptimos la capacidad diagnóstica de los integrantes de la red.
- Brindar asesoría técnica a los elementos de la red que lo soliciten.

## TOMA, MANEJO Y ENVÍO DE MUESTRA

#### Precauciones universales

Todas las muestras para diagnóstico, confirmación o investigación en eventos de interés en salud pública serán consideradas potencialmente infecciosas, por lo que siempre se deben seguir las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, así como las recomendaciones del Manual de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, 2005).

Una muestra biológicamente adecuada se define como la muestra representativa del sitio de la lesión a investigar, en cantidad suficiente, colocada en un envase adecuado y limpio, identificada, conservada y transportada correctamente. Es indispensable revisar el contenido de estos documentos:

- a. Lineamientos para la toma, manejo y envío de muestras para diagnóstico, vigentes
- b. Instructivo para Toma y Recepción de muestras en el InDRE, vigentes

## Recolección y conservación de la muestra

Para el diagnóstico de Leishmaniasis la calidad de la muestra incide directamente con la calidad del resultado. En el cuadro 1 se describen los tipos de muestra para el diagnóstico directo parasitológico, en la tabla 2 las muestras para el diagnóstico indirecto, inmunológico y en el anexo 2 se realiza una descripción detallada para el proceso de toma de las mismas.

Tabla 1. Métodos directos parasitológicos para el diagnóstico de Leishmaniasis.

Métodos directos parasitológicos	
Tipo	Improntas, frotis de lesión y extendidos de médula ósea
Nº de muestras y cantidad	Para diagnóstico: Mínimo: 3 impresiones o frotis en 1 portaobjetos sin teñir. Óptimo: 3 laminillas o frotis con 3 impresiones cada una sin teñir. Laminillas para control de calidad: debe enviar la totalidad de las improntas positivas y 10 % de las negativas, teñidas por Giemsa. *Para el caso de médula ósea debe remitir 2 extendidos sin teñir
Momento de recolección	Al momento de la sospecha y antes de iniciar tratamiento
Contenedor	Portaobjetos nuevos desengrasados y limpios
Conservación	Las improntas, frotis y extendidos de médula ósea que son remitidos para diagnóstico deben ser fijados con metanol y enviados a temperatura ambiente, son estables hasta el momento de su análisis. Para el caso de las muestras que son remitidas para control de calidad únicamente deben conservarse a temperatura ambiente hasta su recepción en el InDRE
Transporte	Enviar a temperatura ambiente, envueltos en cartón, de acuerdo a su calendario de envío de cada uno de los LESP
Observación	Nivel Local → LESP → InDRE
Cultivo <i>In vitro</i>	
Tipo	Biopsias
Nº de muestras y cantidad	Corte de tejido del borde indurado de la lesión que sea de aproximadamente 0.5 cm <sup>3</sup> .

Momento de recolección	Al momento de la sospecha y antes de iniciar tratamiento.
Contenedor	Biopsia: Si la biopsia es menor o igual a 0.5 cm <sup>3</sup> se deposita en tubos medio N´N´N´(previa solicitud de insumo al Laboratorio del InDRE)
Conservación	Temperatura ambiente
Transporte	Debe depositarse en un recipiente hermético a prueba de filtraciones y a temperatura ambiente
Observación	Nivel Local → LESP → InDRE

### Inmunohistoquímica

Tipo	Biopsias
Nº de muestras y cantidad	Corte de tejido del borde indurado de la lesión que sea de aproximadamente 0.5 cm <sup>3</sup> .
Momento de recolección	Al momento de la sospecha y antes de iniciar tratamiento.
Contenedor	Biopsia: Tubo de plástico herméticamente cerrado y rotulado, en formol al 10 %.
Conservación	Temperatura 4 °C.
Transporte	Debe depositarse en un recipiente hermético a prueba de filtraciones y a temperatura menor a 4 °C.
Observación	Nivel Local → LESP → InDRE

### Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Tipo	Suero obtenido sin aditivos
Nº de muestras y cantidad	Mínimo: 1.0 ml Óptimo: 3.0 ml
Momento de recolección	Únicamente cuando cumplan con la definición de caso de <b>Leishmaniasis visceral</b> . en ayuno de 8-12 hrs. y antes de iniciar el tratamiento.
Contenedor	Tubo de plástico herméticamente cerrado y rotulado
Conservación	Temperatura menor a 8 °C
Transporte	Enviar con refrigerantes, manteniendo temperatura de conservación

Observación	Nivel Local → LESP → InDRE
-------------	----------------------------

Para su correcta identificación es imprescindible que cada muestra esté debidamente rotulada con nombre completo y/o No. de identificación, fecha de toma de muestra.

### Envío y transporte de la muestra

El envío de muestras para el servicio de diagnóstico debe ser máximo de 3 días hábiles. En caso de exceder este tiempo se rechazará la muestra en el laboratorio de procesamiento y el responsable de la toma deberá tomar y enviar una nueva muestra.

El tubo con la muestra de suero se empaqueta bien y se envía utilizando el Sistema Básico de Triple Embalaje, se debe proteger de la luz solar y del calor excesivo conservando la temperatura adecuada de transporte entre 4 a 8 °C.

La muestra de biopsias (piel, hígado y bazo) deberán ser recibidas en un lapso menor a 24 h.

Las muestras deberán estar bien selladas y rotuladas con el nombre del paciente, el tipo de muestra y fecha de la toma de la misma. Deberán estar a una temperatura de 2 a 4 °C. Si no cumple con lo anterior, la biopsia será rechazada y se notificará al usuario o responsable del envío, vía fax.

Para muestras de control de calidad deberán enviarse cada mes el 100 % de muestras positivas y el 10 % de muestras negativas (solo se recibirán las muestras del mes inmediato anterior), dentro de los primeros 10 días hábiles del mes.

### Criterios de aceptación y rechazo de muestras

#### Criterios de aceptación de muestras biológicas:

- La muestra de impronta y frotis como mínimo, será aproximadamente de 0.5 mm x 0.5 mm, el extendido de muestra no debe ser grueso.
- La muestra de suero debe ser al menos 1.0 mL.
- Biopsia piel (epidermis), hígado y bazo. El tejido obtenido se enviará en recipiente estéril con solución salina isotónica en un volumen de 3 veces el

tamaño de la biopsia. La biopsia como mínimo será de aproximadamente 1.0 cm<sup>3</sup>.

- Para el cultivo *in vitro* depositar el tejido macerado o el contenido de la biopsia en el interior del tubo con medio de cultivo, manteniendo estrictas condiciones de esterilidad y enviar el tubo a temperatura ambiente.
- Las muestras de control de calidad, deberán ser las que se hayan analizado en el LESP durante el último mes. Únicamente se procesarán en el InDRE las muestras que ingresen dentro de los primeros diez días hábiles del mes en curso.
- La muestra deberá acompañarse:
  - Formato único de recepción de muestras del InDRE (Para muestras de Diagnóstico y Referencia que sean enviadas al InDRE)
  - Historia clínica o en su defecto el resumen de la historia clínica
  - Solicitud del estudio
  - Formato NI para Leishmaniasis

Por cuestiones de bioseguridad la documentación no debe de venir en contacto con la muestra.

#### Criterios de rechazo de muestras biológicas:

- No cumplir con definición de caso
- Muestras contaminadas.
- Si la muestra es rechazada por no cumplir con los criterios administrativos, será resguardada en el laboratorio por 5 días hábiles Si en ese periodo el usuario cumple con los requisitos, a la muestra se le asigna un nuevo folio y se procesará. En caso de que el usuario no envíe la documentación completa y/o correcta de la muestra, el laboratorio de procesamiento podrá decidir si la conserva o desecha. (Tabla 3)
- Improntas y/o Extendidos de Medula Ósea:
  - No cumplir con definición de caso.
  - Laminillas rotas.
  - Muestras con identificación incorrecta.
  - Muestras sin documentación completa y correcta.
  - Improntas cuya calidad de tinción no permita realizar la lectura.

- Suero
  - No cumplir con definición de caso.
  - Muestras con sospecha clínica de LCL y LMC
  - Muestras recibidas con exposición a la luz solar.
  - Muestras que no cumplan con la temperatura de conservación indicada.
  - Muestras con hemólisis intensa o lipemia.
  - Muestras con volumen insuficiente.
  - Muestras con aditivos.
  - Muestras con identificación incorrecta.
  - Muestras en contenedores incorrectos de cualquier tipo.
  - Muestras de pacientes con tratamiento a Leishmaniasis
  - No cumplir con definición de caso.
  
- Muestras de Biopsias
  - No cumplir con definición de caso.
  - Muestras enviadas en solución salina.
  - Muestras con identificación incorrecta.
  - Muestras sin documentación correcta.
  - Muestras que no cumplan con la temperatura de conservación.
  - Muestras enviadas con conservadores diferentes a los solicitados.

**Tabla 3. Causas de rechazo de muestras clínicas**

Causa de rechazo*		
1.0 Calidad de las muestra	2.0 Administrativas	3.0 Clínico epidemiológicas
1.1 Envase inadecuado	2.1 Sin solicitud original de estudio	3.1 Cuadro clínico (definición de caso)
1.2 Envase roto	2.2 Solicitud original de estudio incompleta	3.2 Tiempo de evolución
1.3 Laminilla rota	2.3 Sin formato único del InDRE	3.3 Factores de riesgo (especifique)
1.4 Temperatura inadecuada (especifique)	2.4 Formato único del InDRE incompleto	3.4 Días de tránsito
1.5 Suero-Plasma lipémico	2.5 Sin fecha de depósito y/o pago	3.5 Otra (especifique)

1.6 Suero-Plasma hemolizado	2.6 Sin historia clínica	
1.7 Cantidad insuficiente	2.7 Historia clínica incompleta	
1.8 Muestra contaminada (especifique)	2.8 Sin formato de encuesta	
1.9 Muestra inadecuada (especifique)	2.9 No concuerda número de muestra con oficio	
1.10 Muestra en estado putrefacto	2.10 No concuerdan datos del oficio con la muestra (nombres)	
1.11 Muestra derramada	2.11 Falta convenio institucional	
1.12 Muestra sin identificación	2.12 Otra (especifique)	
1.13 Otra (especifique)		

\* Ver manual de recepción de muestras del InDRE

### Muestra de alto valor

Es aquella que se recibe en el laboratorio y que no cumple con alguno de los criterios de aceptación pero que por las características de evolución (hospitalización, alta, mejoría o defunción) del paciente se considera una muestra de alto valor epidemiológico. Por tal motivo el laboratorio de procesamiento cuenta con la atribución de valorar el rechazo o procesamiento de la muestra.

El laboratorio debe asegurar que en el informe de resultados se indique la naturaleza del problema y debe especificar que se requiere precaución cuando se interprete el resultado. El procesamiento de estas muestras se especifica en el apartado de observaciones.

## ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico etiológico de la Leishmaniasis se obtiene con base en los resultados de las pruebas de laboratorio, en conjunto con los datos clínicos y epidemiológicos. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de la enfermedad requiere de la demostración del parásito.

En los casos crónicos de LCL y LMC, el diagnóstico definitivo es difícil, a veces, por la escasez de parásitos en la lesión. El diagnóstico de la LV es complicado por el hecho de que los signos clínicos y los síntomas de la enfermedad son parecidos a los de otras enfermedades infecciosas.

La naturaleza insidiosa e inespecífica de la LV, así como la reactividad cruzada, pueden confundir el diagnóstico serológico. Por lo tanto, un diagnóstico definitivo de LV depende también de la detección de parásitos por examen de extendidos de médula ósea, ganglio linfático o aspirados de bazo. Aunque los resultados de los procedimientos de diagnóstico no invasivos, como el ELISA o la prueba de aglutinación directa (DAT) se comparan favorablemente con la detección directa del parásito, estas pruebas serológicas no pueden diferenciar entre una LV activa y una infección pasada o subclínica, cuando se determina IgG contra el parásito.



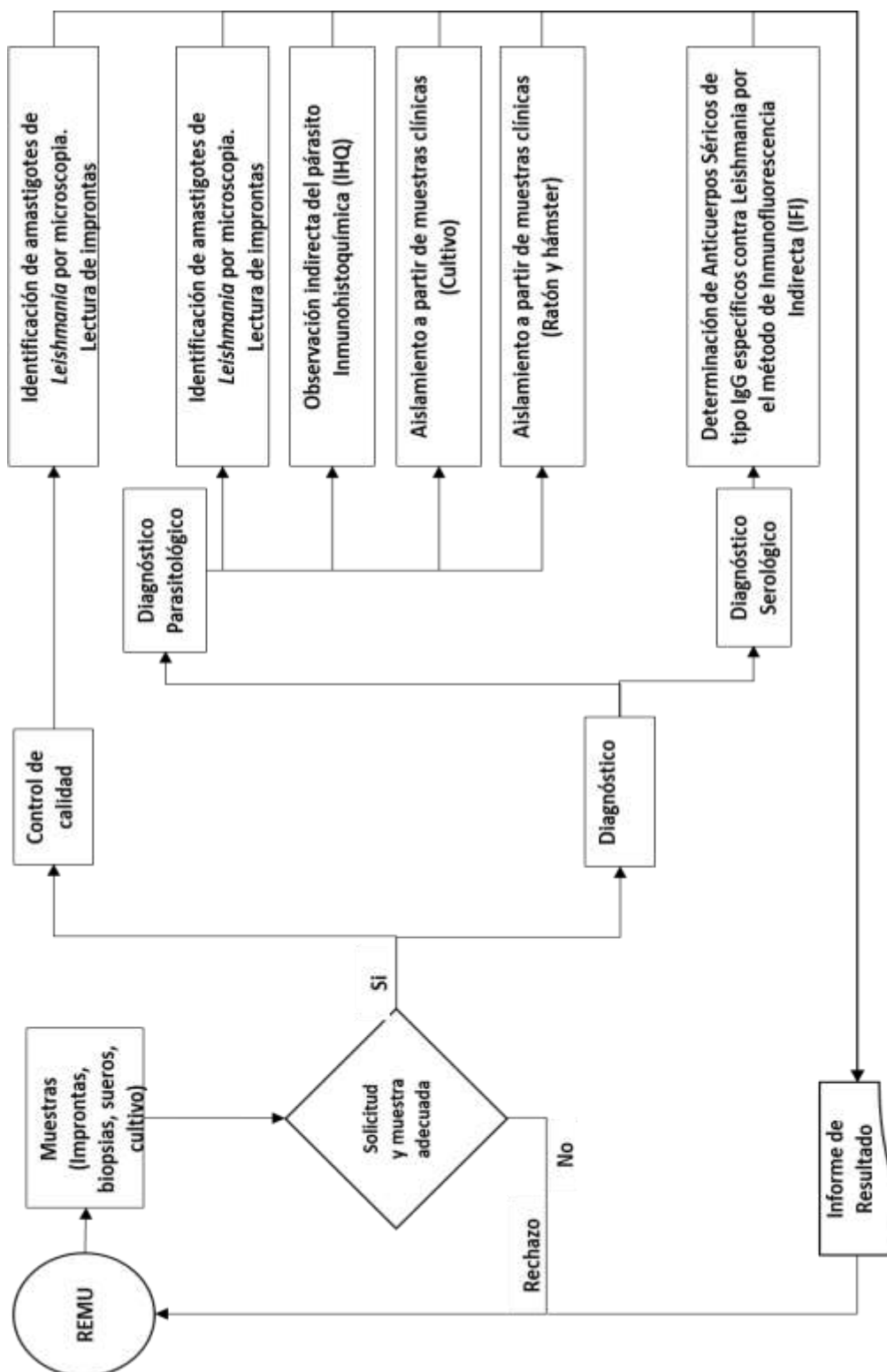


Figura 3. Algoritmo de laboratorio para el diagnóstico de Leishmaniasis.

Clave tabulador 2012 1D2613000 *Leishmania* spp.

Tabla 4. Utilidad de los métodos diagnósticos

	Método	Utilidad
Parasitoscópico	Observación al microscopio en busca de amastigotes a partir de impresiones en portaobjetos de material obtenido de lesiones cutáneas, aspiración del borde de las lesiones o biopsias de tejidos y cultivo de inoculaciones en animales.	Este método es de utilidad para todas las formas clínicas. El diagnóstico definitivo de LV se realiza con extendidos de médula ósea, ganglio linfático o aspirados de bazo.
Inmunológico	Se evalúa la respuesta celular a la aplicación intradérmica del antígeno de Montenegro ( <i>Leishmania</i> ).	Es útil en casos de LCL y LMC. La intradermorreacción no se emplea en casos de LCD y LV debido a la condición anérgica de esta forma clínica.
Serológico	Se emplean las siguientes técnicas: hemaglutinación, inmunofluorescencia indirectas, ELISA.	La serología es de utilidad para LCD y LV.
Molecular	Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR).	Es útil en la detección de cualquier forma clínica de Leishmaniasis, aunado a que es posible distinguir género, complejo e inclusive especie.

Tabla 5. Técnicas diagnósticas

Método diagnóstico	LCL	LCD	LMC	LV
Impronta	++++	++++	++++	NR
Frotis	++++	++++	++++	NR
Extendido de médula ósea	NR	NR	NR	+++
Biopsia (IHQ)	+++	++++	+++	+++
Aislamiento en animales y medios de cultivo	+++	++++	++	++
Serología	NR	++++	++	++++
Intradermoreacción	++++	Negativo	+++	Negativo

NR= no se realiza

++=sensibilidad del 50-60%

+++sensibilidad del 61-90%

++++sensibilidad del 91-100%

## ESTÁNDARES DE CALIDAD EN EL SERVICIO DIAGNÓSTICO

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

Para cumplir con los estándares de calidad en la RNLSP es indispensable apegarse a los Criterios de Operación para la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública Componente Vigilancia Epidemiológica, implementar y mantener un Sistema de Gestión de la Calidad en apego a los requisitos de las normas ISO (International Organization for Standardization) 9001:2015 Sistemas de Gestión de la Calidad e ISO 15189:2015 Requisitos de la calidad y competencia.

Además, alinearse a los requisitos establecidos en el Manual Caminando a la Excelencia, los criterios de liberación de pruebas diagnósticas y cumplir con los indicadores de calidad en el servicio diagnóstico establecidos para la RNLSP

**Fase pre-analítica:** Estos indicadores (Oportunidad en la toma, el envío y porcentaje de rechazo) comprenden actividades propias del área de vigilancia epidemiológica que inciden en la calidad de la muestra.

- **Oportunidad en la Toma:** En el caso de cultivo es indispensable colocar la muestra en el tubo de medio de cultivo N´N´N, antes de 24 horas y conservar a temperatura ambiente.
- **Oportunidad en el envío:** el tiempo de envío al laboratorio de procesamiento hasta su recepción en el mismo, debe ser menor a 2 días naturales.
- **Porcentaje de rechazo:** La proporción de rechazos permitida es del  $\leq 10\%$ . Cuando se registre mayor al 10% del rechazo, el laboratorio debe comunicar al área de vigilancia epidemiológica las oportunidades de mejora con la finalidad de que realicen las acciones conducentes.

**Fase analítica:** este indicador (estándar del servicio) competen a la RNLSP e inciden en la obtención de un resultado confiable y oportuno.

- **Estándar del Servicio:** 3 días hábiles para el servicio de diagnóstico en la RNLSP.

**Fase post-analítica:** corresponde a la emisión del resultado a partir de su obtención. Se describen en el cuadro 7 los tiempos de entrega para la emisión del resultado, de acuerdo al servicio de diagnóstico.

- **Emisión del resultado:** corresponden a los datos descritos en la tabla 6

Tabla 6. Emisión de resultados para el servicio de diagnóstico

Diagnóstico		Tiempo de entrega
Serológico	Visceral	2 días
	Diseminada	2 días

Parasitoscópico	Improntas	2 días
	Biopsias (IHQ)	20 días
	Cultivo <i>in vitro</i>	21 días
	Cultivo <i>in vivo</i>	1 a 6 meses
Inmunológico	Leishmania IDR	2 días

La funcionalidad de una red de diagnóstico para la vigilancia epidemiológica de Leishmaniasis por laboratorio debe evaluarse en las tres fases: 1) Pre-analítica, 2) Analítica, y 3) Post-analítica, de acuerdo a los algoritmos diagnósticos.

**Tabla 6.1. Emisión de resultados para el servicio de control de calidad y referencia**

Tiempo de entrega	
Control de calidad improntas o laminillas	7 días
Referencia(*) serología y laminillas	10 días

(\*) Referencia: Resolución de discordancias

## PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DEL DESEMPEÑO

El Programa de Evaluación Externa del Desempeño (PEED) de La Red Nacional de Microscopistas de Laboratorios de Salud Pública para el diagnóstico de Leishmania, se encuentra incluido en el Panel de Evaluación de Enfermedades Transmitidas por Vector bajo la coordinación del Laboratorio de Paludismo (PEEDMiVec) que incluye además los diagnósticos de paludismo y enfermedad de Chagas. Los laboratorios integrantes de la RNLSP deben participar en este. Los LESP son responsables de implementar y conducir sus propios programas de evaluación del desempeño dirigidos a los laboratorios que integran la red estatal. (Tabla 7)

**Objetivo:** Evaluar la competencia técnica y desempeño de los microscopistas de la red nacional de enfermedades parasitarias transmitidas por vector.

**Tabla 7. Actividades del Programa de Evaluación Externa del Desempeño**

Alcance:	Marco analítico a evaluar, por prueba o algoritmo en los laboratorios con liberación del diagnóstico.
Periodicidad:	Anual
Matriz:	Impresiones y frotis de lesiones causadas por el parásito ( <i>Leishmania</i> )
Envío del panel:	Instructivo del panel y documentos anexos para emisión de resultados
Tiempo de respuesta:	Tercer trimestre del boletín caminando a la excelencia
¿Qué se evalúa?	Concordancia
Formato de resultados:	Impreso y en correo electrónico
Informe general:	Se envían resultados por estado e informe general a la dirección general adjunta
Informe individual:	Se entrega en el informe del tercer trimestre del boletín caminando a la excelencia (BCE)
Acciones de mejora:	Exclusivamente al personal de los LESP

El Laboratorio de Leishmania prepara el material biológico correspondiente como se describe a continuación:

El personal de Laboratorio de Leishmania prepara las improntas, las cuales están conformados por 10 muestras (Laminillas con al menos 3 impresiones de lesión) teñidas con colorante Giemsa, previamente caracterizadas por 2 analistas (Incluyendo expertos técnicos).

#### Características del panel:

- Muestras con y sin presencia de amastigotes.
- Diferente calidad de tinción
- Localización del parásito (Intracelular/Extracelular)
- Grado de parasitemia (+10 y -10 parásitos por impronta)

#### Cuadro 9. Características a evaluar para control de calidad

Características	Observación microscópica	Reporte
Presencia del parásito	Se encontraron amastigotes de <i>Leishmania</i> spp	Positivo
	No se encontraron amastigotes de <i>Leishmania</i> spp	Negativo

### Envío de paneles

La aplicación del panel se realiza de manera escalonada a las entidades federativas participantes, en tres envíos hasta abarcar la totalidad de los microscopistas de cada red estatal, a través de la Coordinación de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (CRNL) del InDRE.

El envío debe cumplir con las normas de bioseguridad vigentes en el país, así como, con los Lineamientos para la gestión del riesgo biológico. Los paneles se acompañan de un instructivo (donde se indican los criterios de evaluación) así como de los formatos correspondientes para su llenado. Los paneles deben ser regresados en las mismas condiciones (triple embalaje) en que son recibidos en cuanto a bioseguridad, limpieza y conservación.

Los LESP, deberán enviar un listado con los nombres de los participantes en el PEEDMiVec y el número del panel que le aplicó. Si presenta discordancias, el LESP deberá de levantar las acciones pertinentes y enviarlas al InDRE. De no hacerlo el LESP no podrá participar en el PEEDMiVEC.

## CRITERIOS PARA LA LIBERACIÓN DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS EN LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE SALUD PÚBLICA PARA LA VIGILANCIA DE LA LEISHMANIASIS

La liberación de cada laboratorio de la RNLSP representa la autonomía diagnóstica, es decir, la autorización de la metodología para realizar el diagnóstico. Adquiere la liberación del diagnóstico el LESP que cumpla lo siguiente:

- Establecer un algoritmo diagnóstico (improntas).
- Participar en el PEEDMiVec por dos veces consecutivas y obtener una calificación mayor o igual al 95 %.
- Tener concordancia (C) en el Boletín Caminando a la Excelencia (BCE) mayor o igual 90 % durante dos años continuos.
- Participar y acreditar el curso anual de Actualización de Enfermedades Transmitidas por Vector y/o Curso en el Diagnóstico de la Leishmaniasis”.

- Obtener una calificación (C+PEED) /2 mayor o igual 95 %.
- Aprobar la visita de verificación (procesos técnicos y administrativos) y obtener el Reconocimiento a la Competencia Técnica que realizan el personal experto del Laboratorio de Leishmania del InDRE.

Mantiene su liberación diagnóstica el LESP que cumpla lo siguiente:

- Cumplir con todo lo descrito en los criterios para la liberación diagnóstica.
- Envío del 100 % de muestras positivas cada mes y el 5 % de negativas cada cuatro meses.

Pierden su liberación diagnóstica los LESP que no cumplen lo siguiente:

- El incumplimiento de algún punto de lo señalado anteriormente tanto para la liberación como para el mantenimiento del diagnóstico.
- No notificar cambios en el responsable del diagnóstico.
- Si el LESP requiere confirmar su desempeño técnico, debe solicitar un panel nuevo, cuyo costo es de acuerdo al tabulador vigente. El panel deberá ser solicitado dentro de los siguientes 10 días hábiles, después de haber recibido el informe final. Cabe mencionar que la calificación obtenida en este panel no será tomada en cuenta para el Boletín Caminando a la Excelencia. El costo del panel corresponde al proceso de evaluación y no implica la adquisición definitiva de las laminillas.
- Concordancias no aceptables (menor al 95 %) en el segundo panel, requerirán de capacitación y establecer nuevamente el envío de muestras para realizar diagnóstico en el InDRE.

## BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO EN EL InDRE

Para fortalecer y complementar a la RNLSP se cuenta con un Banco de Material Biológico el cual consta de un Banco de Sueros y un Banco de Improntas, los cuales están dirigidos hacia los programas de validación de cada técnica empleada en el diagnóstico de la Leishmaniasis en instituciones o servicios particulares de los sectores de salud, control de calidad, referencia o pertenecientes a protocolos de investigación.

### Banco de sueros

El Área de Serodiagnóstico es la encargada de la clasificación y custodia de los sueros que son de interés para el diagnóstico de Leishmania.



## Banco de improntas

Todas las improntas son almacenadas a temperatura ambiente para casos de aclaración de resultado, formación de paneles de evaluación o enseñanza según sea el caso

## BIBLIOGRAFÍA

1. Berman JD. Human leishmaniosis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24:684-703, 1997.
2. Carreira PF, Maingon R, Ward RD, Noyes H, Ponce C, Belli A, Arana B, Zeledon R, Sousa OE. Molecular techniques in the characterization of *Leishmania* isolates from Central America. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 89 (Suppl. 1):31-36, 1995.
3. Desjeux P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat. Q.* 45:267-275, 1992.
4. Grimaldi CJr, Tesh RB, McMahon-Prat D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniosis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:687-725, 1989.
5. Grimaldi CJr, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol Rev.* 6:230-250, 1993.
6. Lugo de Yarbuh A. Studies of the leishmanin skin test positivity in cases with treatment anti-*Leishmania*. *Parasitol al Día.* 21:76-80, 1997.
7. Pearson RD, de Queiroz-Sousa A. Clinical spectrum of leishmaniosis. *Clin. Infect. Dis.* 22:1-13, 1996.
8. Peters W, Killik-Kendrick R, Eds. *The leishmaniasis in biology and medicine.* London. Academic Press, 1987.
9. Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* 13:151-177, 1995.
10. Rodríguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniosis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 32:2246-2252, 1994.
11. Scott P. Differentiation, regulation and death of T helper cell subsets during infection with *Leishmania major*. *Immunol. Res.* 17:229-238, 1998.
12. Singh S, Gilman-Sachs A, Chang K-P, Reed SG. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniosis. *J. Parasitol.* 81:1000-1003, 1995.
13. Singh B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies for parasitic infections. *Int. J. Parasitol.* 27:1135-1145, 1997.
14. Velasco-Castrejón O. Las leishmaniosis en México. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 29:119-126, 1987.
15. Velasco-Castrejón O, Guzmán-Bracho C, Ibañez-Bernal S, Rivas-Sánchez B. Leishmaniosis. Valdespino-Gómez JL, Castrejón o, Escobar-Gutiérrez A. eds. *Enfermedades tropicales en México.* México, D. F. Secretaría de Salud, INDR/SSA, 293-308, 1994.
16. Velasco-Castrejón O, Walton BC, Rivas-Sánchez B, García MF, Lázaro CJ, Hobart O, Roldán S, Floriani-Verdugo J, Munguía-Saldaña A, Berezaluce R. Treatment of cutaneous leishmaniosis with localized current field (radio frequency) in Tabasco, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57:309-312, 1997.
17. Manual para Evaluación del desempeño "Caminando a la excelencia", 2007. INDR.
18. Leishmaniasis: estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del estado de Tabasco, *Salud Pública Méx* 1993; Vol. 35(4):345-350.

19. José Luís Jheman. Leishmaniasis cutánea en el estado de Quintana Roo, México. Rev Mex Derm. 2008; 52(1):3-9.
20. OMS, Manual de lucha contra la Leishmaniasis visceral, División de Lucha Contra las Enfermedades Tropicales, Ginebra, 1996.WHO/LEISH/9.40. pp13, 58.
21. Norma Oficial Mexicana NOM -032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.
22. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, tercera edición, OMS [http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9243546503\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9243546503_spa.pdf).
23. Pardo F.J. Anatomía Patológica, Primera edición, Mosby; 1997.
24. Jorge P. Alvar Ezquerro. Las Leishmaniasis: de la Biología al control. Laboratorio de Referencia para la Leishmaniasis (OMS, 1983), Instituto de Salud Carlos III, Junta De Castilla y León, Madrid, 1997.pp111-117.
25. Miller MJ, et al. Guidelines for safe work practices in human and animal medical diagnostic laboratories. MMWR Surveill Summ. 6; 61:1-102; 2012.
26. Guidelines for Biosafety Laboratory Competency. MMWR. Supplement / Vol. 60; 2011.
27. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014; Geneva: WHO Press; 2012.
28. Chosewood C & Wilson DE. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – 5th ed. CDC-NIH; 2009.
29. European Committee for Standardization. CWA 15793:2011 Laboratory biorisk management standard. Brussels: CEN; 2011.
30. World Health Organization. Laboratory Biosafety Manual – 3rd ed. Geneva: WHO Press; 2004.
31. Programa de entrenamiento en diagnóstico de la Leishmaniasis para las Américas, Cali, Colombia, OPS - Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM); 2016.

## 15. ANEXOS

### Anexo I: Bioseguridad en el laboratorio

Una vez que la muestra se ha recibido en el laboratorio, es responsabilidad del personal asegurar que se cumplan con todos los criterios de bioseguridad y análisis de riesgo biológico que apliquen y que se especifiquen en cada hoja de bioseguridad de los agentes etiológicos y en el programa informático de análisis de riesgo (BioRam, etc;) correspondiente.

La recolección y procesamiento de muestras de pacientes con Leishmaniasis colocan al personal de atención en salud en riesgo de exposición a materiales potencialmente infecciosos.

Para minimizar el riesgo de infección, se deben poner en práctica las técnicas seguras de laboratorio, es decir, uso de equipo de protección personal, recipientes apropiados para la recolección y transporte de muestras, etc., según se describe en el Manual de la OMS sobre bioseguridad de laboratorio 3ra. Edición.

Es necesario el uso obligatorio de batas, guantes, zapato cerrado y lentes de seguridad con el fin de evitar la contaminación de ropa personal de calle. Está prohibido el uso de prendas de laboratorio en lugares como: oficinas administrativas, salas de reuniones.

Disponer los residuos biológicos infecciosos según lo indica la NOM-087-SEMARNAT.

El personal de laboratorio debe contar con capacitación específica en los procedimientos que se realizan y deberá ser supervisado por personal especializados en el área. El acceso al laboratorio deberá estar restringido únicamente al personal del laboratorio. Se deben tomar precauciones extremas con objetos punzocortantes contaminados, así como con los procedimientos en los cuales se pueda crear aerosoles infecciosos o salpicaduras, los cuales deberán ser realizados en un gabinete de seguridad biológica.

El personal deberá contar con evidencia de la capacitación continua en bioseguridad en el laboratorio. El jefe de laboratorio deberá designar al personal autorizado para realizar los diferentes procedimientos dentro de un laboratorio con nivel de bioseguridad 2, así como responsabilizarse de su correcta capacitación.

Las personas con susceptibilidad de adquirir la infección o que esta le resulte peligrosa, no deberán recibir autorización para el manejo de agentes infecciosos ni de animales infectados.

El laboratorio deberá contar con todas las señalizaciones necesarias para el buen desempeño de actividades con agentes Parasitarios. El personal deberá emplear guantes libres de talco y batas desechables. Para sanitizar las áreas y superficies de trabajo.

## Anexo II: Técnicas diagnósticas

### Impronta y Frotis

#### Sistema de muestra primaria

**Improntas:** Las improntas son impresiones de la lesión que se toman con un portaobjetos perfectamente limpio y desengrasado. La impresión no debe ser gruesa.

**Frotis:** Es un extendido de la muestra del paciente en un portaobjetos perfectamente limpio y desengrasado. El frotis no debe ser grueso.

**Extendido de Medula Ósea:** La toma de esta muestra debe llevarse a cabo en un hospital por personal capacitado, quienes realizan la actividad de acuerdo con sus procedimientos, el extendido se coloca en un portaobjetos perfectamente limpio y desengrasado, no debe de ser grueso.

#### Toma de muestra

##### Método improntas

- Disponer del material necesario antes de iniciar el procedimiento
- Registrar los datos del paciente
- Lavarse las manos y colocarse guantes
- Inspeccionar la lesión
- Con una gasa estéril agregar una solución yodada sobre la lesión y limpiar del centro a la periferia con la gasa
- Desinfectar la lesión y la piel circundante con una torunda embebida en alcohol al 70%
- Con solución salina fisiológica terminar de limpiar la lesión y desprender la costra
- Hacer presión con el dedo índice y el dedo pulgar sobre el borde indurado donde se tomará la muestra, este paso se realiza para disminuir la irrigación de sangre hacia la lesión
- Raspar cuidadosamente el borde indurado de la lesión o la piel que cubre la lesión con uno de los lados de un portaobjetos, si se produce sangrado limpiar la lesión con una gasa estéril, esperar a que se produzca un exudado seroso.
- Aplicar la superficie de un portaobjetos desengrasado sobre el exudado.

- Tomar 3 a 4 impresiones en cada portaobjetos. Repetir la operación con 3 portaobjetos.
- Secar a temperatura ambiente, identificar la lámina (con lápiz diamante u otro medio) con los datos correspondientes. Fijar con metanol absoluto y teñir con Giemsa.
- Descartar el material punzo cortante en el envase correspondiente.
- Al terminar la toma de la muestra, hacer presión en la lesión con una gasa estéril hasta controlar el sangrado, si se cuenta con crema antibiótica aplicar y cubrir la lesión con una gasa estéril.

#### Método Frotis:

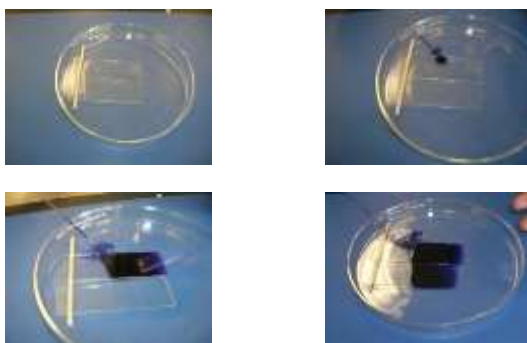
- Disponer del material necesario antes de iniciar el procedimiento.
- Registrar los datos del paciente.
- Lavarse las manos y colocarse guantes.
- Inspeccionar la lesión.
- Con una gasa estéril agregar una solución yodada sobre la lesión y limpiar del centro a la periferia con la gasa.
- Desinfectar la lesión y la piel circundante con una torunda embebida en alcohol al 70%.
- Con solución salina fisiológica terminar de limpiar la lesión y desprender la costra.
- Hacer presión con el dedo índice y el dedo pulgar sobre el borde indurado donde se tomará la muestra, este paso se realiza para disminuir la irrigación de sangre hacia la lesión.
- Con la navaja de bisturí raspar cuidadosamente el borde indurado de la lesión o la piel que cubre la lesión y del exudado seroso tomar y colocar sobre un portaobjetos en forma de circulo en el sentido de las manecillas del reloj (tamaño aproximado de 2 cm de diámetro).
- Tomar 3 frotis en cada portaobjetos. Repetir la operación con 3 portaobjetos.
- Secar a temperatura ambiente, identificar la lámina (con lápiz diamante u otro medio) con los datos correspondientes. Fijar con metanol absoluto y teñir con Giemsa (fuente: CIDEIM).
- Descartar el bisturí en el recipiente para punzo cortantes.
- Al terminar la toma de la muestra, hacer presión en la lesión con una gasa estéril hasta controlar el sangrado, si se cuenta con crema antibiótica aplicar y cubrir la lesión con una gasa estéril.

## Tinción de Giemsa

### Método tradicional

1. Depositar el colorante de Giemsa en la superficie de la muestra, cuidar que la preparación no se seque. Pueden ser utilizadas canastillas de tinción o vasos de Coplin.
2. Realizar iluminación Köhler previamente, observar a inmersión.

**Método de la tinción inversa:** si se coloca el portaobjetos con la cara hacia abajo de la bandeja, se reduce la precipitación del colorante y el precipitado que se forme caerá en la bandeja.



1. Colocar la preparación boca abajo en una capa Petri con un ángulo de diez grados
2. Utilizar una jeringa o pipeta Pasteur para instilar solución colorante
3. Dejar durante 20 a 30 min
4. Enjuagar y dejar secar



**Figura 8 Observar a inmersión 100x. Fuente: Laboratorio de Leishmania.**

Para la verificación estatal se enviarán el 100% de las láminas positivas y el 10% de las láminas negativas de acuerdo a la solicitud y selección del LESP (Manual para evaluación del desempeño “Caminando a la Excelencia”).

### Interpretación por el laboratorio

En el reporte de los resultados para las muestras de diagnóstico se incluye la siguiente información:

**Tabla AII.1 Interpretación de resultados de laboratorio**

Característica	Observación microscópica	Reporte
Presencia del parásito:	Presencia de amastigotes	POSITIVO
	Ausencia de amastigotes	NEGATIVO

En el reporte de los resultados para las muestras de control de calidad se utilizan los siguientes criterios:

**Tabla AII.2 Interpretación de resultados de laboratorio**

Característica	Observación microscópica	Reporte
Presencia del parásito:	Presencia de amastigotes	POSITIVO
	Ausencia de amastigotes	NEGATIVO
Densidad parasitaria:	Menos de 10 parásitos en toda la impronta	- 10
	Más de 10 parásitos en 100 campos	+ 10
Forma parasitaria:	Amastigotes Intracelulares	Intracelular
	Amastigotes Extracelulares	Extracelular
	Amastigotes Intracelulares/ Extracelulares	Intracelulares/ Extracelulares



Tinción	Coloración de la impresión	Alcalina
		Ácida
		Mal teñida
Concordancia	Concordante / Discordante	Concordante / Discordante

NOTA: LAS MUESTRAS PARA CONTROL DE CALIDAD QUE SEAN ENVIADAS CON ALGUNA MARCA, DEBERÁN DE ESPECIFICAR QUÉ TIPO DE MARCAJE PRESENTAN, LÁPIZ DE DIAMANTE, LÁPIZ DE CERA, MARCADOR INDELEBLE U OBJETIVO MARCADOR.

Cuando son detectados amastigotes en una preparación de extendido de médula ósea con historia clínica de probable Leishmaniasis visceral (LV) se realizará la notificación en no más de 24 horas.

#### **Aislamiento de *Leishmania* spp en medios de cultivo y animales de laboratorio.**

Un medio de cultivo generalmente se considera como un medio que favorece el crecimiento de los organismos, por lo cual debe reunir las características apropiadas, de acuerdo al tipo de organismos de que se trate. Parte del inóculo de la biopsia o aspirado de médula ósea se puede cultivar en los casos que se desee aislar la cepa con fines taxonómicos, para realizar pruebas de susceptibilidad a medicamentos, para estudios epidemiológicos y con fines diagnósticos cuando hay una alta sospecha clínica y no ha sido detectado el parásito por otros métodos. Los medios de cultivo utilizados son axénicos mono o bifásicos, el más idóneo es un agar-sangre de conejo al 15%, conocido como NNN (Novy-Nicolle-McNeal).

La inoculación en animales de experimentación se reserva a situaciones de campo cuando el aislamiento en medios de cultivo corre el riesgo de contaminarse, o cuando no hay disponibilidad de microscopía. El sacrificio del animal dos meses después de infectado permite aislar los parásitos del bazo o de la piel en el punto de inoculación.

#### **Aspirado de lesión cutánea**

##### **Procedimiento**

1. Disponer del material necesario antes de iniciar el procedimiento
2. Registrar los datos del paciente

3. Lavarse las manos y colocarse guantes
4. Inspeccionar la lesión, si hay más de una tomar la más reciente, si hay una infección bacteriana severa, el medico deberá tratar primero la infección bacteriana.
5. Con una gasa estéril agregar una solución yodada sobre la lesión y limpiar del centro a la periferia con la gasa.
6. Desinfectar la lesión y la piel circundante con una torunda embebida en alcohol al 70%.
7. Con solución salina fisiológica terminar de limpiar la lesión y desprender la costra.
8. . Hacer presión con el dedo índice y el dedo pulgar sobre el borde indurado donde se tomara la muestra, este paso se realiza para disminuir la irrigación de sangre hacia la lesión.
9. Preparar 4 jeringas de insulina que contengan 0.1 ml de una mezcla de PBS con Antibiótico (Penicilina 1 U/mL, Estreptomicina 100 µg/mL y Gentamicina 100 mg/DL) en cada una de las jeringas proteger la aguja con la cubierta sin hacer presión del embolo.
10. Introducir la aguja de 3 a 4 mm en el borde exterior (borde indurado) formando un ángulo de 45° y aspirar para obtener el líquido tisular realizando movimientos de rotación que favorezcan el desplazamiento del material a través de la jeringa, se debe evitar aspirar sangre (no se debe inyectar la solución de PBS con antibiótico, solo se aspira el contenido de la lesión).
11. Repetir el procedimiento con las otras tres jeringas en puntos diferentes de la lesión.
12. Sembrar en los tubos de NNN.

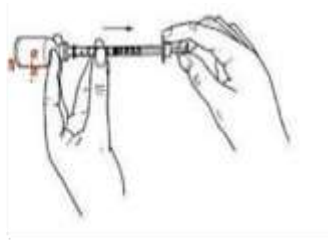
13. Incubar a 20°C.

Fuente: CIDEIM (Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas)  
Figura. 10. Procedimiento para la toma de aspirado.

Inocular 2 animales de experimentación que pueden ser hámsteres, ratones BALB/c en el cojinete plantar de las patas traseras.

Resultados:

1. Cargar con una jeringa de insulina 0.1 ml de una mezcla de PBS con Antibiótico (Penicilina 1 U/ml, Estreptomicina 100 µg/ml y Gentamicina 100 mg/DL



2. Introducir la aguja de 3 a 4 mm en el borde exterior [borde indurado] formando un ángulo de 45° y aspirar para obtener el líquido tisular realizando movimientos de rotación que favorezcan el desplazamiento del material a través de la jeringa, se debe evitar aspirar sangre.



3. Sembrar el contenido de las jeringas en el medio correspondiente, en condiciones de asepsia.

a. Medio de cultivo

**Negativo:** Ausencia de promastigotes.  
**Positivo:** Presencia de promastigotes.

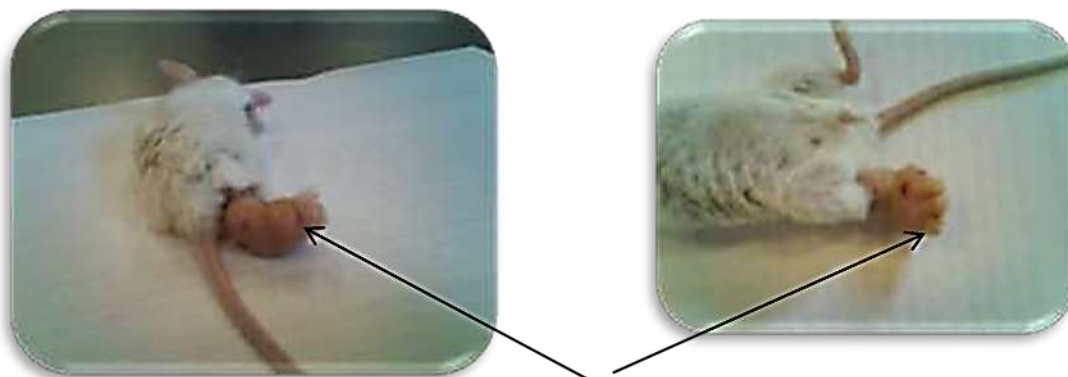
Figura. 11. *Leishmania* spp en fase de promastigotes



#### b. Animales

**Positivo:** Presencia de lesiones más presencia de amastigotes en la impronta de la lesión.

**Negativo:** Ausencia de lesiones y amastigotes en tejido.



**Lesiones causadas por *Leishmania***

Fuente: Laboratorio de Leishmania.  
InDRE

Figura 12. Lesiones causadas por *Leishmania*.

**Nota:** Los tubos de medios de cultivo se solicitan vía oficio al Laboratorio de Leishmania, estos llegan al LESP en refrigeración y deberán regresarlos al InDRE a temperatura ambiente en un lapso no mayor a 24 horas después de tomada la muestra.

#### Biopsia de úlcera

##### Procedimiento

- Previo lavado con agua y jabón, aplicar un antiséptico (alcohol yodado o timerosal) sobre la lesión y piel circundante.
- Cubrir delimitando un campo estéril.
- Tomar la biopsia, ya sea con un equipo de “punch” o de la manera tradicional (escalpelo).
- Separar la biopsia.
- Conservar una cuarta parte en formalina al 10% para histopatología.

- Realizar improntas.
- Conservar en solución salina isotónica una cuarta parte, macerar para sembrar en medio de cultivo y/o inocular animales.

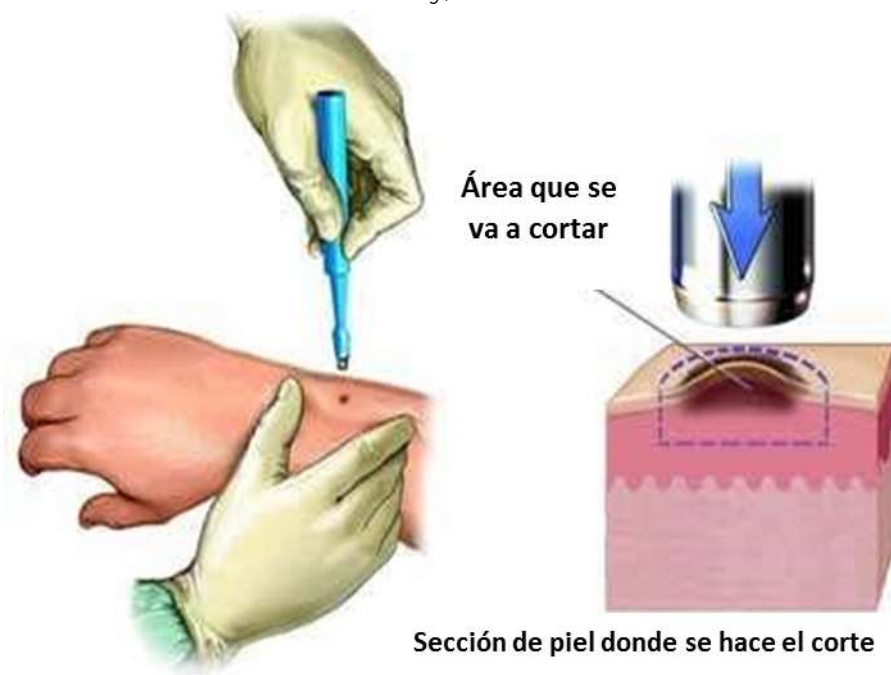


Figura. 13. Biopsia de una lesión cutánea. Fuente: Nucleus Medical Art, Inc.



Figura. 14. Biopsia de lesión cutánea. Fuente: Laboratorio de Leishmania. InDRE

## Resultados

### a. Impronta

**Negativo:** No se observan amastigotes de *Leishmania*

**Positivo:** Se observan amastigotes de *Leishmania*

Figura.15. Presencia de promastigotes de *Leishmania*  
Fuente: Laboratorio de Leishmania. InDRE



### b. Medio de cultivo

**Negativo:** Ausencia de promastigotes.

**Positivo:** Presencia de promastigotes.

### c. Animales

**Negativo:** Ausencia de lesiones y amastigotes en tejido.

**Positivo:** Presencia de lesiones más amastigotes en la impronta de la lesión.

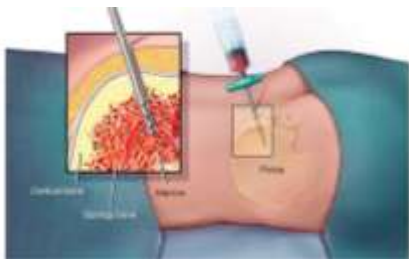
Figura. 16. Presencia de promastigotes lesiones



Fuente: Laboratorio de Leishmania. InDRE

## BIOPSIA DE HÍGADO Y BAZO

La toma de estas muestras debe llevarse a cabo en un hospital por personal capacitado, quien realiza una punción hepática o esplénica (a cielo abierto) y la biopsia se procesa como la de la úlcera o piel.



- La toma debe llevarse a cabo en un hospital por personal capacitado.
- Realizar una punción de médula ósea para obtener 0.5 mL de la muestra.

Figura. 17. Obtención de médula ósea

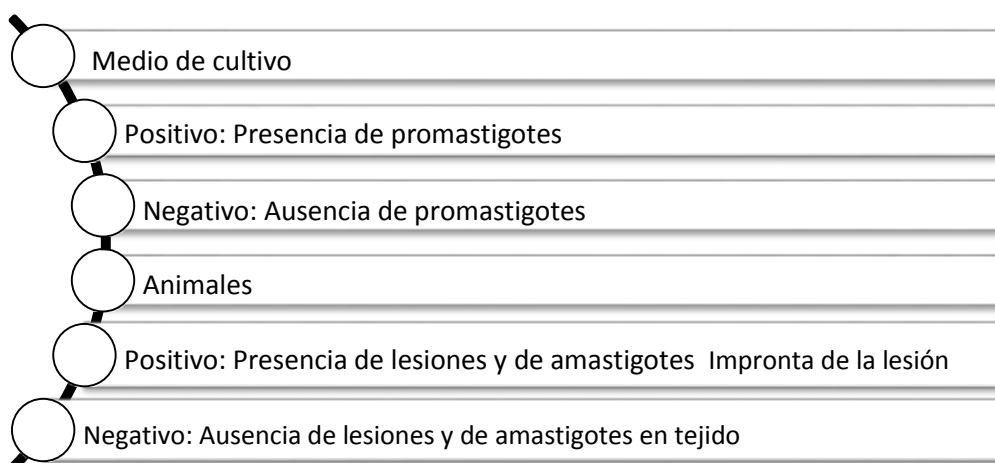
Fuente: <https://www.mayoclinic.org/es-es/tests-procedures/bone-marrow-biopsy/about/pac-20393117>

- Sembrar 0.2 mL de médula ósea en medio de cultivo.
- Inocular 0.2 mL de médula ósea en animales para asilamiento de la cepa.



Figura 18. Inoculación en animales de médula ósea.

Fuente: Laboratorio de Leishmania. InDRE



Nota: Las biopsias deberán ser tomadas por personal médico capacitado en hospital.

### Anexo III: Materiales y preparación de reactivos.

#### Materiales (Identificación de amastigotes de Leishmania por microscopia)

##### Para toma de la muestra:

- Mango con hoja de bisturí del número 3.
- Hoja de bisturí del número 15 desechable.
- Portaobjetos con un espesor de 0.8-1.1 mm y con una medida de 25 x 75 mm.
- Gasas estériles.
- Alcohol etílico al 70% comercial.
- Lápiz de grafito.
- Solución Yodada
- Agua o solución salina estéril.
- Para la tinción
- Colorante Giemsa (puede ser en polvo o líquido).
- Alcohol metílico absoluto.
- Solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2)/Agua destilada.
- Soporte para coloración.
- Pipetas.
- Cronómetro con rango de 1 minuto a 2 horas.
- Gradillas.
- Toallas de papel absorbente.

##### Para lectura, almacén temporal y envío de laminillas

- Aceite de inmersión tipo A (baja viscosidad), se sugiere utilizar en temperaturas menores a 25 °C, B (alta viscosidad) se sugiere utilizar en temperaturas mayores a 30 °C.
- Papel seda.

#### Materiales (Aislamiento de Leishmania spp en medios de cultivo y animales de laboratorio)

##### Para toma de la muestra:

- Jeringas desechables de insulina de 1 mL con agujas de 27 G x 13 mm (0.40 mm x ½")
- PBS con antibiótico.
- Marcador indeleble.
- Gradilla.
- Mechero de alcohol o Bunsen.
- Toallas de papel.


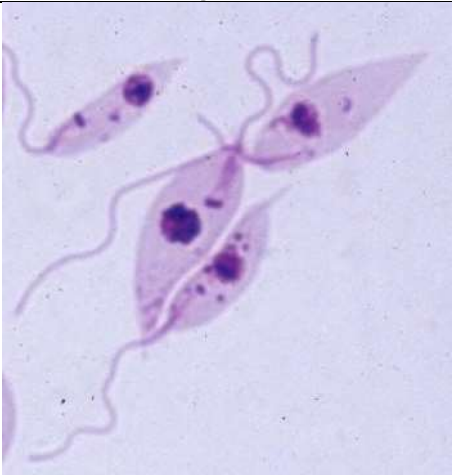


- Alcohol etílico al 70% comercial.
- Solución Yodada
- Agua o solución salina estéril.
- Gasas estériles.
- Si se cuenta disponible tener crema antibiótica.

#### Preparación de la solución de PBS con antibiótico.

En 0.1 mL de PBS + antibiótico (solución de Penicilina 1 U/mL, Estreptomina 100 µg/mL o Gentamicina 100 mg/dL) en una jeringa de insulina.

#### Anexo IV: Imágenes de Portada

Imagen	Fuente
 <p data-bbox="440 1230 607 1262">Imagen AIV.1</p>	<p data-bbox="834 779 1409 810"><a href="https://www.bmj.com/content/341/bmj.c6751">https://www.bmj.com/content/341/bmj.c6751</a></p> <p data-bbox="834 848 1013 879">Lutzomyia spp</p>
 <p data-bbox="440 1766 607 1797">Imagen AIV.2</p>	<p data-bbox="834 1262 1409 1325"><a href="http://histoscientifics.blogspot.com/2016/06/la-histotecnologia-y-la-leishmaniasis.html">http://histoscientifics.blogspot.com/2016/06/la-histotecnologia-y-la-leishmaniasis.html</a></p> <p data-bbox="834 1362 1118 1394">Leishmania mexicana</p>



1939 - 2019

**AÑOS**

*Siendo Referencia Nacional en Salud Pública*

**INDRE**

**SALUD**

SECRETARÍA DE SALUD



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

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