



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

Uso de inmunohistoquímica con suero humano hiperinmune como anticuerpo primario para la detección de *Leishmania sp.* en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, 2021-2025

Use of immunohistochemistry with hyperimmune human serum as a primary antibody for the detection of *Leishmania sp.* at Hospital Nacional Cayetano Heredia, 2021-2025

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN
ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTOR

ANGEL JOSUE RUDAS HUARIPATA

ASESOR

ALEX VENTURA LEON

LIMA – PERÚ

2026



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	RUDAS HUARIPATA ANGEL JOSUE

Pertencientes al programa de **SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN ANATOMIA PATOLOGICA**, autor del proyecto de investigación titulado: **Uso de inmunohistoquímica con suero humano hiperinmune como anticuerpo primario para la detección de *Leishmania sp.* en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, 2021-2025**, el cual ha sido elaborado y aprobado, para optar por el **TITULO DE SEGUNDA ESPECIALIDAD PROFESIONAL EN ANATOMIA PATOLOGICA**, bajo la modalidad de **Proyecto de investigación**.

En calidad de docente (s) asesor (es) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	VENTURA LEON ALEX	MEDICINA	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **18%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3497010716**; fecha de entrega: **03-03-2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 09 de marzo de 2026**

MINISTERIO DE SALUD
HOSPITAL CAYETANO HEREDIA
SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA

DR. ALEX VENTURA LEÓN
MÉDICO ASISTENTE
C.P.S. 58372 R.N.E. 50323

Firma del asesor
N° DNI: 43156084
ORCID: 0000-0002-2433-1184

2. RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria endémica en el Perú, cuyo diagnóstico anatomopatológico se basa principalmente en la observación de los amastigotes en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (H-E). Sin embargo, la sensibilidad de este método disminuye en casos de baja carga parasitaria o en pacientes con enfermedad crónica; por lo que, la inmunohistoquímica puede constituir un método diagnóstico complementario en casos de negatividad con coloración de hematoxilina-eosina. El objetivo del presente estudio es determinar la utilidad diagnóstica de la inmunohistoquímica utilizando suero humano hiperinmune como anticuerpo primario para la detección de *Leishmania* sp en biopsias cutáneas y mucocutáneas. Se realizará un estudio observacional, retrospectivo y descriptivo; que incluirá biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina, procesadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia durante el periodo 2021 a 2025. La inmunohistoquímica se estandarizará mediante prediluciones del suero hiperinmune y la inclusión de controles positivo, negativo y blanco. La utilidad diagnóstica se evaluará comparando los resultados de la inmunohistoquímica con los resultados de tinción con hematoxilina-eosina. Se estimarán sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo, y concordancia interobservador mediante el índice Kappa. Los resultados permitirán determinar si la inmunohistoquímica es útil para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria como método complementario en biopsias con resultados negativos o dudosos por técnicas convencionales.

Palabras Clave: Leishmania, Inmunohistoquímica, Anticuerpos

3. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *Leishmania*, cuando es de afectación cutánea y mucosa se denomina leishmaniasis tegumentaria. En regiones endémicas de América Latina, incluido el Perú, representa un problema relevante de salud pública y constituye un motivo frecuente de evaluación clínica y anatomopatológica en hospitales de referencia (1–2). En el ámbito nacional, Perú es el décimo país del mundo con casos de leishmaniasis, es una enfermedad desatendida y forma parte del grupo de enfermedades metaxénicas sometidas a vigilancia epidemiológica permanente por el Ministerio de Salud. La información consignada en la Sala Situacional de Enfermedades Metaxénicas evidencia la persistencia de casos en diversas regiones del país, predominantemente en los departamentos de Madre de Dios, Cajamarca y Cuzco; con un acumulado de 4322 casos en el año 2025, siendo la forma cutánea más frecuente que la mucocutánea (3).

Desde el punto de vista anatomopatológico, el diagnóstico de la leishmaniasis se realiza mediante cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) y/o Giemsa. Sin embargo, la sensibilidad de estas técnicas es limitada, especialmente en lesiones con baja carga parasitaria, en fases crónicas de la enfermedad o en pacientes previamente tratados; siendo positiva desde una 36% hasta un 78% de los casos, según algunos estudios retrospectivos (4-6).

Ante estas limitaciones diagnósticas, se han incorporado métodos complementarios, como la inmunohistoquímica (IHQ), las técnicas moleculares y la hibridación in situ, con el objetivo de mejorar la detección del parásito en tejido

fijado en formol e incluido en parafina (7). En series comparativas, la inmunohistoquímica ha demostrado una sensibilidad superior a la histopatología convencional; permitiendo identificar *Leishmania* en biopsias previamente negativas por H-E o Giemsa y aumentando de manera significativa la tasa de confirmación diagnóstica (4,7). En el estudio de Luiz Cláudio Ferreira et al. (8), se comparó la tinción de H-E, IHQ e hibridización in situ con cromógeno (CISH), la IHQ tuvo una sensibilidad del 66%, siendo mayor que la tinción de H-E y CISH. Incluso en el estudio de Rocío S. Cardozo et al. (4), la IHQ tuvo un 65% de positividad, frente a un 58% del PCR, lo que indica la utilidad de la IHQ en el diagnóstico anatomopatológico de leishmania.

Dentro del uso de la IHQ, se ha evaluado el uso del marcador CD1a como herramienta diagnóstica indirecta en la leishmaniasis cutánea. Aunque algunos estudios realizados en el Viejo Mundo han reportado sensibilidades elevadas para este marcador, como el estudio de Hasna Riyal et al (9), donde el CD1a tuvo una sensibilidad de 70.9%, incluso en el estudio de Lopez Trujillo et al (10) tuvo una positividad de 93.75%, muy similar a la del PCR que fue de 94%. En particular, estudios realizados en el Perú y otros países del Nuevo Mundo han evidenciado una baja sensibilidad de CD1a frente a especies predominantes del subgénero *Viannia*, como *Leishmania braziliensis* y *Leishmania peruviana*, en el estudio de María C. Ferrufino-Schmidt et al (11), usando la clona MTB1, el CD1a solo fue positivo en el 25% de casos, aun con amastigotes visibles en H-E. Asimismo, el estudio de Lucero Katherine Aristizábal-Parra et al (12), usando la clona EP3622, el CD1a fue positivo en 46,51% de los casos, siendo menor que con tinción H-E, la cual fue del

65.1%, lo que evidencia la baja rentabilidad diagnóstica del CD1a, incluso con diferentes clonas.

En este contexto, el uso de suero hiperinmune, ya sea de humano o animal, como anticuerpo primario para la inmunohistoquímica, ha demostrado ser una mejor alternativa. En el estudio de Celeste Sánchez Romero et al (13), donde usaron como anticuerpo primario suero anti-leishmania policlonal de ratón de un laboratorio de la Universidad de São Paulo para el estudio de IHQ y la compararon con PCR, la sensibilidad de la IHQ fue de 82.3% y la sensibilidad de la PCR fue de 92.8%. En el estudio de Luciana M. Silva-Flannery et al (14), donde usaron como anticuerpo policlonal canino, la IHQ fue positiva en el 59% de los casos. En contraste en el estudio de Fuentes Borda (15), que usó suero de paciente humano hiperinmune, la IHQ una sensibilidad de 92 y una especificidad de 96.4 %, usando una dilución de 1/40 del anticuerpo, a diferencia de los anticuerpos en animales que necesitan dilución de 1/1000. Esto indica la mayor sensibilidad de la IHQ usando suero humano, respecto al suero animal.

En el Hospital Nacional Cayetano Heredia no se cuenta actualmente con un protocolo estandarizado de inmunohistoquímica para Leishmania utilizando suero humano hiperinmune, ni con evaluaciones locales de su validez diagnóstica frente a los métodos histopatológicos convencionales. Por ello, resulta pertinente evaluar de manera sistemática el rendimiento diagnóstico de esta técnica en biopsias cutáneas y mucocutáneas procesadas durante los últimos cinco años, así como analizar su concordancia interobservador y su aporte diagnóstico en comparación con otras estrategias inmunohistoquímicas.

La pregunta de investigación que orienta el presente estudio es: ¿Hay utilidad diagnóstica de la inmunohistoquímica utilizando suero humano hiperinmune como anticuerpo primario para la detección de *Leishmania* sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas procesadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia durante los últimos cinco años?

4. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar la utilidad diagnóstica de la inmunohistoquímica utilizando suero humano hiperinmune como anticuerpo primario para la detección de *Leishmania* sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas procesadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia durante el periodo 2021–2025.

Objetivos Específicos

- Estimar la sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica con suero humano hiperinmune para la detección de *Leishmania* sp., utilizando la tinción con hematoxilina-eosina como referencia diagnóstica operativa.
- Calcular los valores predictivos positivo y negativo de la inmunohistoquímica en comparación con la tinción de hematoxilina-eosina.
- Evaluar la concordancia interobservador en la interpretación de la inmunohistoquímica mediante el índice Kappa.

- Estandarizar el protocolo de inmunohistoquímica mediante diferentes diluciones del suero humano hiperinmune para optimizar la señal diagnóstica.

5. MATERIAL Y MÉTODO

a) Diseño del estudio: Estudio observacional, retrospectivo, descriptivo y de corte transversal.

b) Población: Todas las biopsias cutáneas y mucocutáneas con sospecha clínica e histopatológica de leishmaniasis, fijadas en formol e incluidas en parafina, procesadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia durante el periodo comprendido entre enero de 2021 y diciembre de 2025.

Criterios de inclusión

- Biopsias con diagnóstico histopatológico previo de leishmaniasis y aquellas con sospecha clínica o histológica de leishmaniasis (aunque hayan sido negativas en H-E inicialmente).
- Bloques de parafina con material histológico adecuado para estudio inmunohistoquímico.
- Casos con informe histopatológico disponible.

Criterios de Exclusión

- Biopsias con tejido insuficiente o con artefactos de fijación y procesamiento.
- Biopsias no encontradas en archivo

- Casos que no cuenten con la información clínica mínima necesaria

c) Muestra: La muestra estará constituida por todas las biopsias cutáneas y mucocutáneas con sospecha clínica e histopatológica de leishmaniasis, fijadas en formol e incluidas en parafina, procesadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia en el periodo enero de 2021 y diciembre de 2025, que cumplan con los criterios de inclusión establecidos (muestreo no probabilístico por conveniencia). Al incluirse la totalidad de casos elegibles disponibles, no se realizará cálculo de tamaño muestral.

d) Definición operacional de variables: Anexo 1.

e) Procedimientos y técnicas:

Se recolectará la información de los informes de anatomía patológica mediante una ficha de recolección de datos (Anexo 2). Previa coordinación con las autoridades correspondientes, se realizará la revisión de los registros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia con la finalidad de identificar los casos que cumplan los criterios de inclusión. Para cada caso seleccionado se procederá a la recuperación del bloque de tejido fijado en formol e incluido en parafina; así como de la lámina correspondiente a la tinción convencional con H-E archivada. Las láminas de H-E disponibles serán evaluadas inicialmente mediante microscopía óptica para verificar su estado de conservación y la adecuada visualización de las estructuras histológicas. En aquellos casos en los que la lámina de hematoxilina-eosina se encuentre dañada, desgastada o no permita una adecuada identificación de amastigotes de *Leishmania* sp., se realizará una nueva tinción de

H-E a partir del bloque de parafina correspondiente. En los casos en los que la lámina de H-E se encuentre en adecuadas condiciones para su evaluación histopatológica, no se realizará una nueva tinción; procediéndose directamente a la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica. De cada bloque seleccionado se obtendrán cortes histológicos seriados de 4 μm de espesor, los cuales serán montados en láminas portaobjetos tratadas. Los cortes serán destinados, según corresponda, a la tinción convencional con hematoxilina-eosina y al estudio inmunohistoquímico.

Técnica de inmunohistoquímica

Para la aplicación del método inmunohistoquímico se empleará suero humano hiperinmune anti-Leishmania como anticuerpo primario, el cual será obtenido de un paciente con infección natural por Leishmania sp. que tenga un título de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) mayor a 1:40, ya que la norma técnica del Ministerio de Salud de Perú, considera una prueba IFI positiva con un resultado mayor o igual a 1:40. La obtención del suero será realizado previa firma de consentimiento informado del paciente (Anexo 3). El suero hiperinmune será alicuotado en crioviales y conservado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Para su empleo como anticuerpo primario, el suero será llevado a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Previo a la aplicación del método inmunohistoquímico, se realizará una fase de estandarización del anticuerpo primario, en la cual el suero humano hiperinmune será prediluido en tampón PBS (buffer fosfato salino) a pH 7,2, evaluándose las siguientes diluciones: 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320. La selección de la dilución a emplear en el desarrollo del estudio se

realizará en función de los resultados obtenidos durante esta fase de estandarización, considerando la intensidad del marcaje, la relación señal-fondo y la ausencia de tinción inespecífica.

El procedimiento inmunohistoquímico será desarrollado según el protocolo empleado por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia (16) (Anexo 4). Para el revelado de la reacción inmunohistoquímica se utilizará cromógeno rojo, seleccionado con la finalidad de evitar confusión con pigmentos endógenos como melanina y hemosiderina, los cuales pueden interferir en la interpretación cuando se emplean cromógenos de color marrón.

Control de calidad

En cada corrida de inmunohistoquímica se incluirán controles positivos, controles negativos y controles blancos. El control positivo corresponderá a una biopsia previamente confirmada como positiva para *Leishmania* sp.; el control blanco consistirá en la omisión del anticuerpo primario; y el control negativo corresponderá a una biopsia tegumentaria de otra patología distinta de leishmaniasis.

Responsable de la ejecución técnica

Los procedimientos de procesamiento histológico, la coloración con hematoxilina-eosina y la ejecución de la técnica de inmunohistoquímica serán realizados por un tecnólogo médico capacitado y con experiencia en el área de Anatomía Patológica, perteneciente al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia, siguiendo los protocolos institucionales vigentes.

Interpretación de resultados

La inmunohistoquímica será considerada positiva cuando se observe inmunomarcaje de color rojo, compatible con amastigotes de *Leishmania* sp., predominantemente localizados en el interior de macrófagos, sobre un fondo tisular azul claro proporcionado por el contrateñido.

La evaluación de las láminas teñidas con hematoxilina-eosina y de las láminas procesadas por inmunohistoquímica será realizada de manera independiente por dos médicos patólogos, quienes desconocerán los resultados del método alternativo, con la finalidad de evaluar la concordancia interobservador. Discrepancias entre patólogos serán resueltas por consenso y/o por un tercer patólogo.

f) Aspectos éticos del estudio:

El presente proyecto será sometido a evaluación y aprobación por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y por el Comité de Ética del Hospital Nacional Cayetano Heredia, así como al jefe del Servicio de Anatomía Patológica del ya mencionado hospital, previo al inicio de su ejecución. El estudio será de carácter retrospectivo y se realizará utilizando biopsias cutáneas y mucocutáneas fijadas en formol e incluidas en parafina, archivadas en el Servicio de Anatomía Patológica; por lo que no se requerirá la obtención de consentimiento informado individual. No se realizará ningún procedimiento adicional ni intervención directa sobre los pacientes. La información clínica y anatomopatológica será manejada de manera confidencial. Para este fin, a cada caso se le asignará un código numérico, garantizando el anonimato de los

pacientes y evitando la utilización de datos que permitan su identificación. Los resultados obtenidos serán utilizados exclusivamente con fines académicos y científicos. La obtención y el uso del suero humano hiperinmune anti-Leishmania se realizarán respetando los principios éticos de la investigación biomédica, previa autorización correspondiente y con consentimiento informado del donante, asegurando la confidencialidad de su identidad y el uso exclusivo del material biológico para los fines del presente estudio.

g) Plan de análisis:

La información recolectada será registrada en una base de datos en el programa de Microsoft Excel para MAC y posteriormente procesada utilizando el programa IBM SPSS Statistics 25 para Mac. Se realizará un análisis descriptivo de las variables del estudio. Las variables cualitativas se resumirán mediante frecuencias absolutas y relativas, mientras que las variables cuantitativas, de corresponder, se describirán utilizando medidas de tendencia central y dispersión. Para evaluar la utilidad diagnóstica de la inmunohistoquímica utilizando suero humano hiperinmune anti-Leishmania, se construirá una tabla de contingencia 2×2 comparando los resultados de la inmunohistoquímica con los resultados de la tinción convencional con H-E, considerada como referencia diagnóstica operativa. A partir de dicha tabla se calcularán la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, junto con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. La concordancia interobservador en la interpretación de la inmunohistoquímica será evaluada mediante el índice Kappa de Cohen, interpretándose de acuerdo con los criterios establecidos en la literatura. Los resultados del análisis serán presentados

en tablas y gráficos, y se considerará un nivel de significancia estadística de $p < 0,05$.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yupari-Azabache IL, Díaz-Ortega JL, Bardales-Aguirre LB, Barros-Sevillano S, Paredes-Díaz SE. *Cluster analysis of factors associated with leishmaniasis in Peru*. Trop Med Infect Dis. 2023;8(11):484. doi:10.3390/tropicalmed8110484.
2. Ministerio de Salud (PE). *Norma Técnica de Salud para la Vigilancia Epidemiológica de la Leishmaniasis en el Perú*. NTS N.º 225-MINSA/CDC-2025. Lima: Ministerio de Salud; 2025.
3. Ministerio de Salud (PE). Dirección General de Epidemiología. *Mapa interactivo de enfermedades metaxénicas* Internet. Lima: MINSA; citado 8 ene 2026. Disponible en: https://app7.dge.gob.pe/maps2/shiny_metaxenicas_web/
4. Cardozo RS, García-Montero PP, Chicharro C, Tardío JC. *Cutaneous leishmaniasis: a pathological study of 360 cases with special emphasis on the contribution of immunohistochemistry and polymerase chain reaction to diagnosis*. J Cutan Pathol. 2021;48(6):770-781. doi:10.1111/cup.13785.
5. Palma VA, Crespín MM, Hidalgo PA, González AD, Lozada DA, Nacimba GA, et al. *Diagnostic advances in tegumentary leishmaniasis: a narrative review from 2018 to 2023*. J Public Health Emerg. 2024;8:36. doi:10.21037/jphe-24-51.
6. Akbar S, Qadir A, Khan H. *Diagnostic accuracy of Cd1a immunohistochemical evaluation in comparison with H & E and Giemsa for cutaneous leishmaniasis*. J Health Rehabil Res. 2023;3(2):842-847. doi:10.61919/jhrr.v3i2.272.
7. González K, Calzada JE, Díaz R, Paz H, García V, Miranda A, et al. *Performance of immunohistochemistry as a useful tool for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Panama, Central America*. Parasitology International. 2019;71:46-52. doi:10.1016/j.parint.2019.03.007.
8. Ferreira LC, Quintella LP, Schubach AO, Miranda LFC, Madeira MF, Pimentel MIF, et al. *Comparison between colorimetric in situ hybridization, histopathology, and immunohistochemistry for the diagnosis of New World cutaneous leishmaniasis in human skin samples*. Trop Med Infect Dis. 2022;7:344. doi:10.3390/tropicalmed7110344.
9. Riyal H, Samaranyake N, Amarathunga P, Munidasa D, Karunaweera N. *Evaluation of CD1a immunostaining in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania donovani in Sri Lanka*. Parasitology. 2024;151:1148-1153. doi:10.1017/S0031182024000799.

10. Lopez-Trujillo E, González-Farré M, Pujol RM, Bellosillo B, Fisa R, Riera C, et al. *Diagnostic usefulness of immunohistochemical evaluation of CD1a antigen and polyclonal anti-Leishmania antibodies in cutaneous leishmaniasis*. *Histol Histopathol*. 2021;36:567-576. doi:10.14670/HH-18-324.
11. Ferrufino-Schmidt MC, Bravo Puccio F, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Boggild AK, LeBoit PE. *Is CD1a useful for leishmaniasis diagnosis in the New World?* *J Cutan Pathol*. Epub ahead of print. doi:10.1111/cup.13369.
12. Aristizábal-Parra LK, Ospina-Gómez JP, Restrepo-Rivera L, Ramírez JD, Ospina-Varón CM, González JD, et al. *Evaluating CD1a immunohistochemistry for tegumentary leishmaniasis diagnosis in the New World: a focus on Colombia*. *Am J Dermatopathol*. 2025;47(3):197-205.
13. Sánchez-Romero C, Martelli Júnior H, Ribeiro da Matta VL, Freitas LM, de Mattos Soares C, Mariano FV, et al. *Immunohistochemical and molecular diagnosis of mucocutaneous and mucosal leishmaniasis*. *Int J Surg Pathol*. 2019;27(7):1-8. doi:10.1177/1066896919876706.
14. Silva-Flannery LM, de Almeida ME, da Silva AJ, Bollweg BC, Fair PS, Ritter JM, et al. *A diagnostic algorithm for detection of Leishmania spp. in human fresh and fixed tissue samples*. *Am J Trop Med Hyg*. 2024;111(1):51-58. doi:10.4269/ajtmh.23-0387.
15. Fuentes Borda JC. *Validación de la inmunohistoquímica como método diagnóstico para Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas en el Hospital Regional Cusco, enero a junio del 2018* [tesis de licenciatura]. Cusco (PE): Universidad Andina del Cusco; 2019.
16. Hospital Nacional Cayetano Heredia. *Guía de Procedimiento Asistencial de Inmunohistoquímica (aprobada por Resolución Directoral N.º 190-2024-HNCH-DG)* [Internet]. Lima: HNCH; 2024 [citado 10 ene 2026]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/hnch/normas-legales/5771698-190-2024-hnch-dg>

7. PRESUPUESTO Y CRONOGRAMA

Presupuesto:

Concepto	Cantidad	Costo unitario (S/.)	Costo total (S/.)
Salarios			
Asesor del proyecto	1	0	0
Patólogos	3	0	0
Tecnólogo médico	1	0	0

Equipos e Instrumentos			
Reactivos para inmunohistoquímica (buffers, bloqueadores, soluciones)	1	3000	3000
Anticuerpo primario (suero humano hiperinmune / anticuerpo anti- <i>Leishmania</i>)	1	0	0
Sistema de detección (polímero HRP/AP)	1	2000	2000
Cromógeno rojo	1	1200	1200
Material de laboratorio (portaobjetos, cubreobjetos, crioviales, pipetas, guantes)	1	400	400
Impresiones, copias y encuadernación	1	200	200
Total estimado			6800

Cronograma:

Actividad	2026						
	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul
Planificación y elaboración del proyecto	X						
Presentación y aprobación del proyecto		X	X				
Recuperación de bloques y láminas H-E				X			
Estandarización de la inmunohistoquímica					X		
Procesamiento IHQ y lectura de láminas					X		
Análisis estadístico						X	
Redacción final y publicación							X

8. ANEXOS

Anexo 1: Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Medición	Tipo de variable	Indicador
Edad	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta el momento de la toma de la biopsia	Edad registrada en el informe anatomopatológico	Años cumplidos	De razón Continua	No aplica
Sexo	Condición biológica del paciente	Sexo consignado en el informe anatomopatológico	Masculino Femenino	Nominal Dicotómica	Masculino / Femenino
Localización de la lesión	Zona anatómica donde se obtuvo la biopsia	Ubicación descrita en el informe anatomopatológico	Registro textual	Nominal Politómica	Cutánea / Mucosa / Mucocutánea
Resultado H-E	Identificación histológica de amastigotes de <i>Leishmania sp.</i> mediante tinción convencional	Observación microscópica de amastigotes en láminas teñidas con H-E	Presencia o ausencia	Nominal Dicotómica	Positivo / Negativo
Resultado de inmunohistoquímica (IHQ)	Detección de <i>Leishmania sp.</i> mediante inmunomarcaje con suero humano hiperinmune	Observación de inmunomarcaje rojo compatible con amastigotes en macrófagos	Presencia o ausencia de marcaje	Nominal Dicotómica	Positivo / Negativo
Resultado diagnóstico final	Confirmación anatomopatológica de leishmaniasis	Integración de hallazgos de H-E e IHQ	Registro diagnóstico	Nominal Dicotómica	Confirmado / No confirmado
Sensibilidad de la IHQ	Capacidad de la IHQ para identificar correctamente	Proporción de casos positivos por IHQ entre los	Cálculo estadístico	Cuantitativa Proporción	Porcentaje de sensibilidad

	casos verdaderos de leishmaniasis	positivos por H-E			
Especificidad de la IHQ	Capacidad de la IHQ para identificar correctamente casos negativos	Proporción de casos negativos por IHQ entre los negativos por H-E	Cálculo estadístico	Cuantitativa Proporción	Porcentaje de especificidad
Valor predictivo positivo (VPP)	Probabilidad de que un resultado positivo por IHQ sea un verdadero positivo	Casos verdaderos positivos / total de positivos por IHQ	Cálculo estadístico	Cuantitativa Proporción	Porcentaje de VPP
Valor predictivo negativo (VPN)	Probabilidad de que un resultado negativo por IHQ sea un verdadero negativo	Casos verdaderos negativos / total de negativos por IHQ	Cálculo estadístico	Cuantitativa Proporción	Porcentaje de VPN
Concordancia interobservador	Grado de acuerdo entre patólogos en la lectura de IHQ	Comparación de lecturas independientes de dos patólogos	Índice Kappa	Cuantitativa Continua	Kappa (<0.4 pobre, 0.4–0.6 moderada, >0.6 buena)

Anexo 2: Ficha de recolección de datos

Código del caso: _____

I. Datos generales del paciente

1. Edad: _____ años

2. Sexo: Masculino Femenino

II. Datos de la muestra anatomopatológica

3. Tipo de muestra: Biopsia cutánea Biopsia mucosa Biopsia mucocutánea

4. Localización anatómica de la lesión: _____

5. Año de procesamiento de la biopsia: _____

III. Resultados histopatológicos (Hematoxilina-Eosina)

6. Resultado de H-E: Positivo para Leishmania sp. Negativo

7. Observación microscópica: _____

IV. Resultados de inmunohistoquímica

8. Resultado de IHQ con suero humano hiperinmune: Positivo Negativo

9. Patrón de marcaje observado:

Amastigotes intracelulares en macrófagos

Otro: _____

V. Diagnóstico anatomopatológico final

10. Diagnóstico final: Leishmaniasis confirmada No confirmada

VI. Concordancia interobservador

11. Lectura Patólogo 1: Positiva Negativa

12. Lectura Patólogo 2: Positiva Negativa

13. ¿Hubo discrepancia?: Sí No

14. Resultado final tras consenso: Positivo Negativo

VII. Observaciones adicionales

Anexo 3: Consentimiento Informado para participación del paciente con suero hiperinmune

Título del estudio

Uso de inmunohistoquímica con suero humano hiperinmune como anticuerpo primario para la detección de Leishmania sp. en biopsias cutáneas y mucocutáneas.

Nombre del investigador responsable: Angel Josué Rudas Huaripata

Invitación a participar

Usted está siendo invitado(a) a participar de manera voluntaria en un proyecto de investigación que se desarrollará en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Nacional Cayetano Heredia. Antes de decidir su participación, es importante que lea cuidadosamente la información que se presenta a continuación. Si tiene alguna duda, podrá realizar todas las preguntas que considere necesarias.

Propósito del estudio

El objetivo del estudio es evaluar la utilidad diagnóstica de la inmunohistoquímica utilizando suero humano hiperimmune como anticuerpo primario para la detección de *Leishmania sp.* en muestras de tejido. Su participación permitirá contribuir al desarrollo de métodos diagnósticos complementarios que podrían mejorar la identificación de esta enfermedad.

Procedimiento

En caso de aceptar participar, se le solicitará la autorización para la obtención de una muestra de sangre venosa, la cual será utilizada exclusivamente para la obtención de suero con altos títulos de anticuerpos contra *Leishmania sp.* La extracción será realizada por personal de salud capacitado, siguiendo las normas de bioseguridad vigentes. El suero obtenido será procesado, almacenado y utilizado únicamente con fines de investigación en el marco de este estudio.

Riesgos y molestias

La extracción de sangre puede ocasionar molestias leves, como dolor transitorio en el sitio de punción, aparición de hematomas o sensación de mareo. No se prevén riesgos mayores asociados al procedimiento. En todo momento se tomarán las medidas necesarias para minimizar cualquier incomodidad.

Beneficios

Usted no recibirá un beneficio directo por su participación. Sin embargo, la información obtenida podría contribuir al fortalecimiento de las técnicas diagnósticas para la leishmaniasis, beneficiando a futuros pacientes.

Confidencialidad

La información obtenida durante el estudio será manejada de forma confidencial. Los resultados serán utilizados únicamente con fines académicos y científicos.

Participación voluntaria

Su participación es completamente voluntaria. Usted puede decidir no participar o retirarse del estudio en cualquier momento, sin que ello genere ningún tipo de perjuicio en su atención médica presente o futura.

Uso de la muestra biológica

El suero obtenido será utilizado exclusivamente para los fines descritos en este estudio. No será empleado en investigaciones adicionales ni transferido a terceros sin una nueva autorización expresa.

Contacto

Si tiene alguna pregunta relacionada con el estudio o con sus derechos como participante, podrá comunicarse con el investigador responsable o con el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

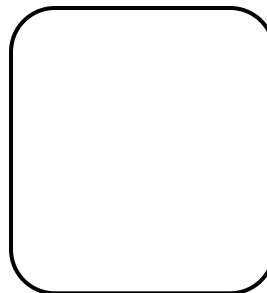
Declaración de consentimiento

He leído la información proporcionada, he tenido la oportunidad de realizar preguntas y he recibido respuestas satisfactorias. Declaro que comprendo el propósito del estudio y acepto de manera voluntaria participar en la investigación, autorizando la obtención y uso de mi muestra de sangre para los fines descritos.

Nombre del participante: _____

Firma y huella del participante: _____

Fecha: ____/____/____



Anexo 4: Protocolo de procedimiento inmunohistoquímico

1. Enfriar los bloques seleccionados hasta -20°C .
2. Rotular las láminas de acuerdo al código asignado.
3. Realizar cortes con el micrótopo, de 3 a 4 micras dependiendo del tejido.
4. Recoger el corte obtenido con una lámina de vidrio y colocar en baño de flotación, manteniendo una temperatura cercana a 50°C , con una variación máxima de $\pm 2^{\circ}\text{C}$.
5. Las láminas serán transferidas a un recipiente con agua fría y recoger nuevamente el corte de tejido con una inclinación de 45° , evitar formar burbujas y dejar secar a temperatura ambiente
6. Las láminas serán sometidas a calentamiento en estufa a 60°C por 1 hora

7. Inmersión en xilol o sustituo de xilol, en dos tiempos consecutivos de 5 minutos cada uno.
8. Inmersión en alcohol absoluto en dos tiempos consecutivos de 5 minutos cada uno.
9. Inmersión en alcohol de 96° en dos tiempos consecutivos de 5 minutos cada uno.
10. Las láminas serán llevadas a agua destilada, permitiendo la completa hidratación durante 5 minutos.
11. Recuperación antigénica usando baño maría con solución recuperadora a 96°C por 45 minutos.
12. Posteriormente dejar enfriar a temperatura ambiente de 5 a 10 minutos.
13. Los cortes serán colocados en cámara húmeda y sometidos a lavados sucesivos con solución tampón.
14. aplicar agente bloqueador de la actividad peroxidasa endógena durante 5 a 10 min.
15. Lavar con solución de lavado (solución salina tampón fosfato) por 3 veces, de 1 minutos cada uno.
16. Agregar el anticuerpo primario y dejar reposar durante 25 minutos.
17. Lavar con solución de lavado (solución salina tampón fosfato) por 3 veces, de 1 minutos cada uno.
18. Colocar el polímero (HRP) por 30 minutos aproximadamente.
19. . Lavar con solución de lavado (solución salina tampón fosfato) por 3 veces, de 1 minutos cada uno.
20. Agregar el cromógeno rojo por 1 a 5 minutos.
21. Lavar con solución de lavado (solución salina tampón fosfato) por 1 minuto y luego con agua destilada.
22. Evaluación microscópica de la tinción.
23. Contratinción nuclear utilizando hematoxilina, seguida de una solución alcalina para resaltar las estructuras tisulares.
24. Evaluación microscópica de tinción y contratinción.
25. Deshidratación progresiva mediante alcoholes de concentración creciente.

26. Aclaramiento con xilol o sustituto de xilol por 2 minutos.

27. Montaje permanente mediante la aplicación de medio de montaje y laminilla cubreobjeto