



## Estandarización y validación de pruebas de elisa tipo indirecto para la determinación de los niveles de anticuerpos IgG e IgE anti-*leishmania*, como método complementario para el diagnóstico y seguimiento de la respuesta al tratamiento

Standardization and validation of elisa indirect type tests for the determination of the levels of IgG and IgE antileishmania antibodies, as a complementary method for diagnosis and follow-up of the response to treatment

**CHOQUEHUANCA, JOSÉ LUIS<sup>1</sup>**  
**SOSA, LUIS FERNANDO<sup>1</sup>**  
**BONIFAZ, DIEGO<sup>2</sup>**

FECHA DE RECEPCIÓN: 27 AGOSTO DE 2019

FECHA DE ACEPTACIÓN: 20 DE SEPTIEMBRE DE 2019

### Resumen

La leishmaniasis cutánea se caracteriza por la inducción de una respuesta inmune celular y humoral, siendo los niveles de anticuerpos IgG e IgE indicadores serológicos del diagnóstico, la progresión y resolución de la enfermedad. En el presente estudio se estandarizaron dos pruebas de ELISA indirecto para determinar los niveles séricos de anticuerpos IgG o IgE contra antígeno soluble de *Leishmania braziliensis* (ASL). Se trabajó a partir de la cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). En el ELISA IgE se hizo un pretratamiento del suero con anticuerpos anti-IgG humano y Polietilenglicol (PEG); la dilución óptima de la muestra para ambos ELISA fue 1/21, la dilución del conjugado fue 1/500 para el ELISA IgG y 1/100 para el IgE.

Para el ELISA IgG estandarizado se encontró un índice de correlación de *Kappa* de 1 ( $p < 0,05$ ), frente al ELISA comercial r-

### Abstract

Cutaneous leishmaniasis is characterized by the induction of a cellular and humoral immune responses, at levels of IgG and IgE indicators serological diagnosis, progression and resolution of disease. In this study two indirect ELISA tests were standardized to determine serum levels of IgG or IgE antibodies against soluble *Leishmania braziliensis* antigen (ASL). We worked from the strain of *L. braziliensis* (MHOM / BR / 75 / M2903). In the IgE ELISA pretreatment serum was done with anti-human IgG and Polyethylene glycol (PEG) antibodies; The optimal dilution of the sample for both ELISA was 1/21, the conjugate dilution was for 1/500 and 1/100 IgG ELISA for IgE.

For standardized ELISA IgG index *Kappa* correlation of 1 ( $p < 0.05$ ) compared to commercial ELISA r-Biopharm® found. With a sensitivity of 100%; 100% specificity, 100%

1 Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética, Instituto SELADIS

2 Laboratorio de Genética y Biología Molecular LABOGEN SRL

Biopharm®. Con una sensibilidad del 100%; 100% de especificidad, 100% valor predictivo positivo y 100% valor predictivo negativo. Sin embargo ambos test de ELISA presentaron reacciones cruzadas con anticuerpos anti-*Trypanosoma*. La validez de los resultados demuestran que los ELISAs estandarizados pueden ser utilizados como herramienta de diagnóstico y seguimiento al tratamiento leishmanicida.

### **PALABRAS CLAVE**

Leishmaniasis, ELISA, IgG, IgE, Estandarización

positive predictive value and negative predictive value 100%. However both ELISA test showed cross-reactions anti-trypanosome antibodies. The results demonstrate that both ELISA can be used as diagnostic and monitoring tool. Being necessary to continue studies to validate these procedures and identify other possible cross-reactions.

### **KEY WORDS**

Leishmaniasis, ELISA, IgG, IgE, Standardisation

## **INTRODUCCIÓN**

Las *leishmaniasis* son un grupo de enfermedades parasitarias producidas por protozoos flagelados del género *Leishmania* que infectan principalmente a los macrófagos del hospedero, y otras células como neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y fibroblastos del hombre y mamíferos como el perro, roedores y marsupiales. Se transmite por la picadura del insecto vector flebótomo en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo (familia *Phlebotomidae*).

A nivel mundial existen alrededor de 12 millones de casos reportados de *leishmaniasis* y se estima que 350 millones de mujeres, hombres y niños de 88 países están en riesgo de contraer la enfermedad, 72 de estos países están en vías de desarrollo y 13 de ellos son considerados los países más pobres del mundo (Ministerio de Salud Pública, 2011).

En Bolivia, aproximadamente 800000 personas que viven en zonas tropicales y subtropicales están riesgo contraer la de infección (Ibañez Calero, 2008) y se calcula que existen 2 500 nuevos casos por año con una incidencia de 32.7% (Ministerio de Salud, 2012), Los parásitos asociados con *leishmaniasis* en nuestro país son: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. chagasi* y *L. guyanensis*; siendo las regiones endémicas para estas especies los departamentos de La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Beni, Pando y Tarija (Ministerio de Salud, 2012).

La defensa del organismo infectado con *Leishmania* involucra tanto la inmunidad celular como la humoral. En la primera intervienen macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y linfocitos T. La segunda esta mediada principalmente por anticuerpos IgG e IgE específicos contra *Leishmania* que son producidos gracias a las citoquinas generadas de la interacción entre linfocitos B y T. (Sousa, M.A. 2005). Un gran número de investigaciones han demostrado que en casos de una terapia leishmanicida exitosa especialmente con antimoniales pentavalentes, los niveles de anticuerpos IgG, IgM e IgE están significativamente reducidos con respecto a los niveles séricos antes del tratamiento (Atta, A.M. 2002).

El diagnóstico inicialmente se realiza en base a la presentación clínica de la lesión y la observación microscópica de los promastigotes en el frotis de lesión. La inmunofluorescencia indirecta (IFI), la reacción en cadena de la polimerasa y el ELISA indirecto suelen ser herramientas que ayudan al diagnóstico definitivo de la enfermedad en caso de parasitemias bajas. También son útiles para el seguimiento de la eficacia terapéutica y progresión de la enfermedad. (Salud O. M., 2010) (Oddone, R.; Canese, A., 2005). Por lo antes expuesto, en el presente estudio se estandarizó y validó dos test de ELISA indirecto que miden los niveles de anticuerpos de tipo IgG y tipo IgE contra antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Cultivo de Parásitos

Los promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) fueron cultivados en medio Schneider's suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina y estreptomycin al 0,5%) en una caja de cultivo de 25 cm<sup>3</sup>. Los promastigotes fueron cultivados en estufa a 26 °C haciendo "pases" o cambios de medio cada 72 horas, para las pruebas in vitro fueron cosechados durante la fase estacionaria de crecimiento.

### Obtención del antígeno soluble de *Leishmania* (ASL)

Se recuperó el contenido de una caja de cultivo en un tubo Falcon de 15 ml, se realizaron tres lavados con tampón PBS (NaCl 130mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4 y 0,01M), luego, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, desechando el sobrenadante. Luego del tercer lavado, se resuspendió el precipitado en un volumen de 6 ml de PBS, se realizó el recuento de parásitos en cámara de Neubauer. Se realizó un protocolo de sonicación directa (100 watos y 3 pulsaciones por segundo), cumpliendo 10 ciclos alternos de 1 min. de sonicación y 30 seg. de reposo. A partir de la muestra total sonicada, se evaluaron dos protocolos, en el primero no se hizo ningún tratamiento adicional (Khairul, 1999), en el segundo protocolo se centrifugó la muestra a 6500g/15 min y se trabajó solo con el sobrenadante (Atta, 1998). En ambos casos la concentración de ASL fue evaluada por el método de Lowry obteniendo una concentración de entre 18 y 235 µg/ml, finalmente se guardaron las alícuotas de ASL a -20°C hasta el momento de su utilización.

Preparación de las placas de microtitulación de ELISA con ASL. Se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano Greiner bio-one (CELLSTAR®) por adsorción pasiva con la solución de ASL a las concentraciones de 20, 10 o 5 µg/ml. Se evaluaron dos tampones diluyente de ASL: Tampón Carbonato-bicarbonato 0,1 M pH 9.6 y el Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M pH 7.4, NaCl 1mM. Se sembraron 100 µl por pozo de la solución de ASL y se pre incubó por 30 minutos en agitación suave a 250 rpm y 37°C. Luego, se incubaron las placas a 4°C durante toda la noche. Para eliminar el antígeno no fijado o mal fijado a la superficie de los pocillos se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%.

En el pos tapizado se evaluaron dos soluciones bloqueantes que son comúnmente empleadas en los test de ELISA (PBS–Albumina Sérica Bovina (BSA) al 0,1 % o PBS–Leche Morinaga al 5 %), se añadieron 200  $\mu$ l de la solución de bloqueo respectiva y se dejó en incubación a 37°C de una a dos horas. Esta acción se realizó para tapizar los sitios activos que no fueron recubiertas por el ASL (bloqueo de sitios activos de los micropozos). Después, se procedió a lavar los pozos como se mencionó anteriormente y se guardaron las placas a -4 °C hasta su utilización.

### **Estandarización de la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos IgG anti-*leishmania***

Para la estandarización del ELISA IgG se evaluaron los protocolos por triplicado:

- a. Determinación de la dilución óptima de los sueros: Se evaluaron las diluciones 1/21, 1/51, 1/100 y 1/500 de los sueros de referencia, control positivo (+) y negativo (-) en PBS–Tween-20 con BSA al 0,1 %. Se añadió 100 $\mu$ l por pocillo en las placas de ELISA que contenían ASL a las concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu$ g/ml, se evaluaron diferentes temperaturas de incubación a 37°C (30 minutos, 1 hora y 2 horas), y se lavó las placas.
- b. Determinación del título óptimo del conjugado: se evaluaron las diluciones 1/100 y 1/500 de la anti-inmunoglobulina humana IgG conjugado con peroxidasa (Sigma-Aldrich, USA) en PBS–Tween-20–BSA 0,1%, se añadieron 100 $\mu$ l de estas diluciones por pocillo, se incubó a 37°C por 30 minutos o 1 hora y se lavaron las placas.
- c. Adición del cromógeno-sustrato: se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de una solución de OPD disuelto en tampón citrato-fosfato 0,05 M pH 5 y 18 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (minutos antes de sus uso) y se dejó en incubación a 37°C por 30 min.
- d. Parado de la reacción enzimática: se realizó añadiendo 50 $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N por pocillo. Posteriormente se realizaron lecturas de las densidades ópticas a 490 con filtro de referencia a 630 nm en un lector de ELISA (Bio-teck Instruments Inc, USA).

### **Estandarización de la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos IgE anti-*leishmania*.**

Para eliminar la competencia por el sitio activo del determinante antigénico por las inmunoglobulinas de tipo IgG (Atta, 1998), se realizó un pre-tratamiento a los sueros controles positivos (+) y negativos (-) con una solución de anticuerpos anti-IgG humano diluido 1/500 en solución salina fisiológica (SSF). Para ello se mezcló 200  $\mu$ l de los sueros control con 25  $\mu$ l del precipitante de IgG y se incubó por una hora a 26°C en agitación constante a 250 rpm. Luego, se añadieron 160  $\mu$ l de SSF y 60  $\mu$ l de polietilenglicol al 12,5 % (PEG) se mezcló bien y se dejó en incubación por 30 min. a 37°C, se centrifugaron los tubos a 3500 rpm por 15 min. El sobrenadante libre de IgG fue utilizado para estandarizar la prueba de ELISA.

- a. Determinación de la dilución óptima de los sueros: Tomando en cuenta el factor de dilución previo, se hizo el ajuste a diluciones 1/10 y 1/21 de los sueros control positivo (+) y negativo (-), se empleó como diluyente PBS-Tween 20-BSA al 0,1 %. Para evaluar la efectividad del proceso de precipitación de IgGs se evaluó sueros pre-tratados y sueros sin pre-tratamiento, se añadió 100µl por pocillo en las placas de ELISA con concentraciones de 10 y 20 µg/ml de ASL, se incubó a 37°C por una hora y se lavaron las placas.
- b. Determinación del título óptimo del conjugado: se evaluaron las diluciones 1/100 y 1/500 de la anti-inmunoglobulina humana IgE conjugado con peroxidasa en PBS-Tween 20-BSA 0,1 %, se añadieron 100 µl por pocillo e incubó a 37°C por 30 min. Después se lavaron las placas tres veces.
- c. Adición del cromógeno-sustrato: se añadieron 100 µl por pocillo de la solución de OPD disuelto en tampón citrato-fosfato 0,05 M pH 5 y se dejó en incubación a 37°C por 30 min.
- d. Posteriormente, se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N por pocillo. La lectura de las densidades ópticas: se realizó de la misma manera que para el ELISA IgG.

Repetitividad y reproducibilidad de los datos de los test de ELISA estandarizados.

Para determinar la repetitividad y reproducibilidad de los ELISA estandarizados, se evaluaron mediante sueros control positivo y negativo que fueron tomados al azar de entre los sueros utilizados durante el proceso de estandarización. Para ambos parámetros se procesó las muestras bajo las condiciones de trabajo establecidas como óptimas para cada ELISA. El proceso de reproducibilidad fue realizado de manera cegada por diferentes operadores.

## Validación de los ELISA estandarizados

Para los dos ELISA estandarizados se realizó el test diagnóstico con un panel de 15 sueros positivos para *leishmaniasis* y 10 sueros negativos gentilmente cedidos por el laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Laboratorios en Salud (INLASA). En el caso del ELISA IgG anti ASL se determinó la correlación de resultados frente a un kit ELISA comercial que determina anticuerpos IgG anti *Leishmania* (r-biopharm, Alemania). En el caso del ELISA que mide anticuerpos IgE contra ASL, al no existir un kit comercial que mida este tipo de anticuerpos, se realizó la validación frente a la condición de sano o enfermo de los pacientes ya que estos mediante clínica y laboratorio de les había descartado o confirmado la enfermedad. Se realizaron los cálculos de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y el índice *Kappa* para determinar el grado de correlación entre los dos métodos utilizados.

## RESULTADOS

Obtención del antígeno soluble de *Leishmania* (ASL).- No se encontró diferencias notables a nivel de la cantidad de ASL obtenido entre los dos protocolos evaluados, se evidenció que existía proporcionalidad entre las concentraciones de ASL obtenidas ( $p > 0,05$ ): Sin embargo en la práctica, se obtuvieron mejores resultados con el protocolo de obtención de ASL a partir del sobrenadante de los promastigotes sonicados. Este protocolo de obtención de ASL permitía obtener una concentración de antígenos proteicos en el rango de rango de 180 a 230  $\mu\text{g/ml}$ .

### Condiciones óptimas de trabajo de las pruebas de ELISA estandarizadas

Se determinó que para lograr un tapizado óptimo de los pocillos de ELISA tipo IgG, se deben sembrar por pozo 100  $\mu\text{l}$  de ASL a la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  diluido en tampón carbonato/bicarbonato 0,01M, pH 9,6; el post tapizado debe realizarse con 200  $\mu\text{l}$  de PBS-BSA al 0,1%. Se deben sembrar 100  $\mu\text{l}$  de los sueros o controles diluidos 1/21 en PBS-Tween-20 con BSA al 0,1% e incubarse por una hora. El lavado de la placa se debe realizar tres veces con 300  $\mu\text{l}$  de PBS-Tween 20 al 0,05%. Se adiciona 100  $\mu\text{l}$  de conjugado diluido 1:500 y se incuba por 30 minutos. Se repite el proceso de lavado y se añade 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de una solución de 2,2 mg/ml de OPD y 1,8  $\mu\text{l/ml}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , incubándose por 30 minutos. La reacción debe ser detenida con la adición de 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3N por pocillo. Y las densidades ópticas deben leerse a las longitudes de onda de 490-630 nm. Todos los procesos de incubación se realizaron a 37°C.

En el caso del ELISA que mide niveles de anticuerpos IgE, se estableció que el tapizado de ASL debe realizarse en las mismas condiciones que para IgG con la salvedad de que el antígeno debe estar a la concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$ . En este ELISA todos los tiempos de incubación, el proceso de lavado de las placas, y de dilución de: muestras, controles y conjugado fueron realizados en las mismas condiciones que en el ELISA mencionado en el párrafo anterior. Se estableció que debe sembrarse 100  $\mu\text{l}$  suero libre de anticuerpos IgG a la dilución 1/21 e incubar por una hora, debe sembrarse 100  $\mu\text{l}$  del conjugado a la dilución 1/100 e incubarse por 30 minutos; sembrar 100  $\mu\text{l}$  del cromógeno/sustrato (OPD/ $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e incubar por otra media hora, la parada de la reacción y la lectura de las densidades ópticas se realizó como en el ELISA antes mencionado.

### Determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados

La línea de corte de cada test de ELISA se obtuvo procesando 50 muestras negativas para *leishmaniasis* por clínica y laboratorio. Para el ELISA IgG anti *Leishmania* el valor promedio de las DO de las muestras fue **0,203 ( $p < 0,05$ )**,

con desviación estándar de **0,019**, la línea de corte se estableció sumando 3 veces la desviación estándar ( $3 \times 0,019$ ) al valor promedio, estableciéndose un valor de corte de **0,260**. Para el ELISA IgE anti *Leishmania* el valor promedio de las DO de las muestras negativas fue **0,114** ( $p < 0,05$ ), desviación estándar **0,017**, estableciéndose un valor de línea corte una valor de DO de **0,155**. Durante la determinación de la línea de corte a manera de control de calidad se evaluaron 15 muestras positivas para *leishmaniasis* diferentes a las utilizadas en el proceso de estandarización antes mencionado (figuras 1 y 2).

Figura 1. Determinación de la línea de corte del ELISA IgG anti-*Leishmania braziliensis* estandarizada procesando 50 muestras negativas.

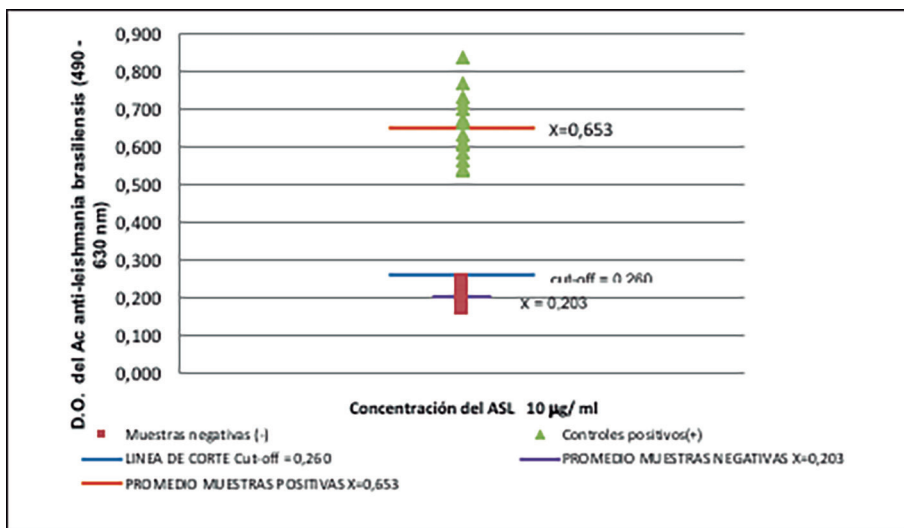
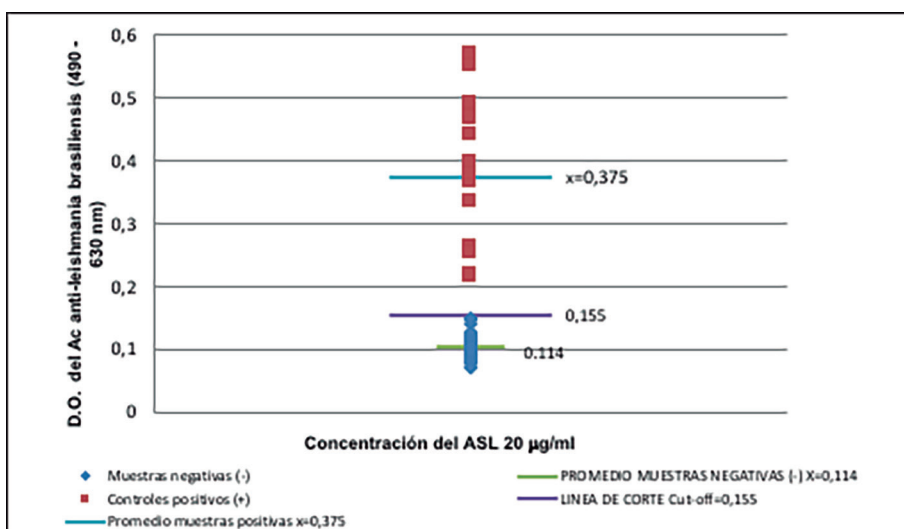


Figura 2. Determinación de la línea de corte del ELISA IgE anti-*Leishmania braziliensis* estandarizada procesando 50 muestras negativas.



## Repetitividad y reproducibilidad de los datos de los test de ELISA estandarizados.

Los resultados de repetitividad de los ELISA IgG o IgE anti-*Leishmania* estandarizados en el laboratorio se muestran en las tablas 1 y 2. Se destaca en el caso del ELISA IgG que las desviaciones estándar (DS) son  $\leq 0,008$  unidades de D.O y que los coeficientes de variación (CV) tanto de muestras positivas como negativas fueron menor al 1%. En el caso del ELISA IgE los hallazgos fueron similares siendo las DS igual a 0,002 y los CV  $\leq 2,1\%$ .

**Tabla 1. Resultados de determinación de la repetitividad interensayo de los ELISA estandarizados que miden anticuerpos anti antígeno soluble de *Leishmania*.**

REPETITIVIDAD DEL ESTUDIO								
	ELISA IgG				ELISA IgE			
	Suero (+)	PROMEDIO	Suero (-)	PROMEDIO	Suero (+)	PROMEDIO	Suero (-)	PROMEDIO
<b>ANALISIS 1 Tiempo 0</b>	0,886	<b>0,885</b>	0,214	<b>0,218</b>	0,423	<b>0,425</b>	0,085	<b>0,084</b>
	0,883		0,221		0,426		0,082	
<b>ANALISIS 2 a 48 horas</b>	0,867	<b>0,869</b>	0,222	<b>0,220</b>	0,425	<b>0,423</b>	0,081	<b>0,082</b>
	0,871		0,217		0,421		0,083	
<b>ANALISIS 3 a 96 horas</b>	0,879	<b>0,884</b>	0,227	<b>0,223</b>	0,426	<b>0,424</b>	0,086	<b>0,083</b>
	0,888		0,219		0,422		0,079	
<b>ANALISIS 4 a 144 horas</b>	0,875	<b>0,880</b>	0,224	<b>0,220</b>	0,428	<b>0,427</b>	0,084	<b>0,086</b>
	0,884		0,215		0,426		0,088	
<b>ANALISIS 5 a 192 horas</b>	0,869	<b>0,867</b>	0,221	<b>0,226</b>	0,421	<b>0,423</b>	0,080	<b>0,082</b>
	0,864		0,231		0,424		0,083	
<b>PROMEDIO</b>		<b>0,877</b>		<b>0,221</b>		<b>0,424</b>		<b>0,083</b>
<b>DS</b>		<b>0,008</b>		<b>0,003</b>		<b>0,002</b>		<b>0,002</b>
<b>CV</b>		<b>0,010</b>		<b>0,015</b>		<b>0,004</b>		<b>0,021</b>

En la tabla 2, se muestra los resultados de la evaluación de la reproducibilidad de los resultados de los ELISA estandarizados, se observa que para ambos, las DS no superan el valor de 0,004 unidades de DO y que el CV fue menor al 1% para las muestras positivas y no mayor al 2,1% en el caso de las muestras negativas.



**Tabla 2. Resultados de reproducibilidad de los ELISAs estandarizados obtenidas de los tres análisis realizados a los sueros control positivo y negativo a diferentes tiempos**

	IgG		IgE	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
T1	1,102	0,225	0,425	0,068
T2	1,110	0,231	0,421	0,065
T3	1,103	0,235	0,428	0,066
<b>PROMEDIO</b>	<b>1,105</b>	<b>0,230</b>	<b>0,425</b>	<b>0,066</b>
<b>DS</b>	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>	<b>0,004</b>	<b>0,002</b>
<b>CV</b>	<b>0,004</b>	<b>0,022</b>	<b>0,008</b>	<b>0,023</b>

### Test diagnóstico (validación) para determinar la correlación de resultados de los ELISA estandarizados.

En la tabla 3, se muestra los resultados del test diagnóstico, en el que se determinó un 100% de correlación de resultados entre el ELISA estandarizado que mide anticuerpos IgG anti ASL frente al kit de referencia comercial ; se determinaron valores de Sensibilidad del 100%, Especificidad 100%, VPP y VPN del 100% respectivamente, el índice de correlación de *Kappa* encontrado fue de 1,00 ( $p < 0,05$ ). Para el ELISA que mide anticuerpos IgE anti ASL los valores encontrados de sensibilidad, especificidad VPP y VPN fueron del 100% para cada caso, el índice de correlación de *Kappa* también fue de 1,00 ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3. Resultados de los paneles de sueros positivo y negativo según los ELISAs estandarizados frente a un kit comercial en el caso de la determinación de anticuerpos IgG o pacientes sanos y enfermos en el caso de la determinación de anticuerpos IgE.**

		ELISA IgG			ELISA IgE		
		MUESTRAS PROCESADAS POR EL ELISA COMERCIAL RIDASCREEN-BIOPHARM®			CONDICION DEL PACIENTE SANO / ENFERMO		
		POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL	ENFERMO	SANO	TOTAL
MUESTRAS PROCESADAS POR EL ELISA ESTANDARIZADO	POSITIVOS	15	0	15	15	0	15
	NEGATIVOS	0	10	10	0	10	10
	TOTAL	15	10	25	15	10	25

## DISCUSIÓN

La bibliografía científica plantea diferentes métodos para la obtención de antígeno soluble de *Leishmania*, cada uno con características peculiares, Khairul (1999) plantea que los promastigotes deben estar en fase estacionaria de crecimiento, y se debe realizar la “cosecha ” después del tercer o cuarto “pase de cultivo” luego, se deben lisar los parásitos y cuantificar para determinar la concentración de proteínas. Otro método plantea que después del sonicado de la muestra, esta debe ser centrifugada a 4300 g (6800 rpm) para obtener el antígeno soluble de *Leishmania* a partir del sobrenadante (Khairul, 1999). En el presente trabajo se evidenció que cuando se tapiza los micropozos de ELISA con el ASL proveniente directamente del sonicado, las impurezas contenidas en el ASL son reconocidas de manera inespecífica (reacción cruzada) por anticuerpos IgG, favoreciendo resultados falsos positivos en el ensayo. Al centrifugar el ASL y trabajar con el sobrenadante se eliminan estas uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Los resultados demostraron que no existe diferencia significativa al utilizar uno u otro tampón (Carbonato/Bicarbonato y Fosfato Salino), (Iniesta, 2007) como diluyente del ASL en el tapizado. Sin embargo en el postapizado, cuando se utilizó la solución de PBS–Leche Morinaga al 5%, se pudo evidenciar que las absorbancias tanto de las muestras positivas como negativas eran elevadas (DO mayor) en relación al tampón PBS-BSA al 0,1%, tanto de las muestras positivas como de las negativas.

Si bien los investigadores S. Iñiguez y K. Anam, trabajaron con métodos de obtención de ASL similares al nuestro, la concentración de ASL que utilizaron en sus estudios fueron de 2,5 µg/ml y 20 µg/ml para IgG e IgE, respectivamente, lo cual difiere de los resultados obtenidos en el presente estudio que fueron de 10µg/ml y 20 µg/ml respectivamente.

Para determinar la dilución de suero y del conjugado, se evaluaron 4 protocolos de trabajo (Choquehuanca, 2011) con diferentes tiempos de incubación y diluciones, tanto del suero como del conjugado (dato no mostrado). Estas diferencias se hicieron en base a estudios previos publicados (Ministerio de Salud Publica, 2011) (Iniesta, 2007) (Khairul, 1999) (Souza A. A., 1999) y la experiencia de nuestro laboratorio en la realización de ELISA para diagnóstico de otras patologías, encontrando el segundo protocolo el más apto para nuestro estudio, con tiempos de incubación de los sueros control de 1 hora, 30 minutos del conjugado y del sustrato y a una dilución del conjugado de 1/500, se obtuvieron los mejores resultados, mayor discriminación entre los resultados de sueros positivos y negativos, los valores de absorbancia estuvieron dentro de los rangos que nos habíamos propuesto de >0,800 para los positivos y <0,300 para los controles negativos.

El pre-tratamiento realizado para eliminar la competencia por el sitio activo del determinante antigénico del ASL por los anticuerpos tipo IgG anti-*Leishmania*, demostró que, a diferencia de Souza, y Atta, que utilizaron para este fin anticuerpos IgG anti IgG-humana y reactivo absorbente de factor reumatoideo (RF), existe una disminución promedio de los niveles de DO de IgG del 43,24% en caso de los sueros positivos y 18,50% para los negativos.

En el estudio realizado por Atta se muestra que existe una disminución del 39,2% de disminución para los sueros positivos, en relación con otro método de eliminación que solo alcanza el 11% (Atta, y otros, 2002). En nuestro estudio, también se muestra que, el pre-tratamiento elimina la interferencia producida por estos anticuerpos y se observa un porcentaje promedio de disminución de las DO de IgE de 61,93% para las muestras positivas y 32,0% para las muestras negativas.

Basado en experiencias anteriores de estandarización de ELISA, al procesar 50 muestras negativas se encontró un valor promedio de 0,203 ( $p < 0,05$ ) y una desviación estándar de 0,019, sumando 3 veces la desviación estándar ( $3DS = 0,057$ ) al promedio, se determinó que, el valor de la línea de corte era de 0,260, esta sumatoria de 3 DS al promedio de DO también fue utilizada por Souza, M.L.B., Iniesta, V y de Sousa, M.A.

Para determinar la línea de corte del ELISA IgE anti-*Leishmania* estandarizado se procedió de la misma forma que para el ELISA IgG, encontrando un valor de línea de corte de 0,155. En la determinación de anticuerpos IgE realizado por AM Atta, se encontraron valores promedio de sueros positivos  $DO = 0,108$  y de  $DO = 0,104$  en el estudio realizado por M.L.B. Souza, cabe resaltar que ambos estudios fueron realizados para la determinación de *leishmaniasis* visceral y al igual que para IgG anti-*Leishmania* no reportan los valores de línea de corte.

Se encontró el 100% de concordancia al medir la repetitividad y la reproducibilidad de ambos ELISA estandarizados, tanto en sueros control positivo como negativo, en la repetitividad se presentó una diferencia promedio máxima del suero control positivo de  $DO = 0,018$  y de  $DO = 0,008$  en el suero control negativo para el ELISA IgG y de  $DO = 0,004$  y de  $DO = 0,004$  respectivamente para el ELISA IgE, al realizar ambos análisis a 5 tiempos diferentes con intervalos de 48 horas y bajo las mismas condiciones.

La validación del ELISA IgG estandarizado se hizo frente al ELISA comercial r-Biopharm®, se observó que las absorbancias obtenidas eran muy parecidas tanto de las muestras positivas como de las negativas no existiendo una diferencia mayor a 0,180 unidades de DO en el caso de las muestras positivas y 0,100 en el caso de las muestras negativas, se observó también que existe un 100% de correlación de resultados verdaderos positivos y verdaderos negativos del 100% (índice de correlación de *Kappa* de 1;  $p < 0,05$ ),

Sousa, M.A. (2005) demostró que existe una correlación positiva entre los niveles séricos de IgE anti-*leishmania* y la reacción de Montenegro, lo cual sugiere que estos anticuerpos participan en el proceso de la inmunorregulación de la *leishmaniasis* cutánea. En el presente estudio al no contar con un kit comercial que mida IgE anti-*Leishmania* que esté validado para uso en diagnóstico, realizamos la validación frente a la condición de sano o enfermo de los pacientes establecida mediante parámetros clínicos y de laboratorio, este kit casero también demostró una eficiencia diagnóstica del 100% e índice de *Kappa* de 1,00 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, se observó que el ELISA tipo IgG da un

100% de reacción cruzada con sueros de pacientes que cursan enfermedad de Chagas; en el caso del ELISA IgE se determinó un 93,3% de reacciones cruzadas (datos no mostrados). A este respecto, Atta, A.M. y Souza, M.L.B. (2002) estandarizaron estos tipos de ELISA, demostrando para sus test valores de sensibilidad y especificidad 100%, ninguno de los investigadores muestran datos acerca de las posibles reacciones cruzadas de sus ELISA frente a parásitos de la familia Trypanosomatidae. Otro aspecto a resaltar de los dos ELISA estandarizados es el hecho de que en las evaluaciones de precisión intra e inter ensayo demostraron coeficientes de variación menores al 2,1%. Con todos los datos obtenidos se ha demostrado que la rigurosidad empleada para estandarizar los ELISA, ha permitido demostrar la validez de los kits caseros para ser utilizados como pruebas de diagnóstico de laboratorio y de seguimiento de la respuesta al tratamiento en pacientes con *Leishmaniasis*. No menos importante es también el hecho de que el análisis de costo permite disminuir en un 65% el costo que implica la realización de un ELISA mediante kits comerciales, esto permitiría que pacientes de bajos recursos económicos puedan a bajo costo acceder al laboratorio para el diagnóstico y seguimiento de su enfermedad.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales al Dr. Luis Fernando Sosa, responsable del Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS; Dra. Katuska Gonzales, profesora de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas (FCFB) de la Universidad Mayor de San Andrés; Dr. José Antonio Santalla, responsable del Laboratorio de Parasitología y Entomología del instituto INLASA; Dra. Grace Ruiz, investigadora del Instituto de Investigaciones Farmacéuticas y Bioquímicas (FCFB – UMSA); Dra. Jacqueline Calla, responsable del laboratorio de Inmunología del Instituto SELADIS y al Instituto de Servicios de Laboratorios de Diagnostico e Investigación en Salud SELADIS.

## REFERENCIAS

- Atta, A.M., Sousa, A. Atta, M., D'Oliveira, A., Almeida, R., Araújo, M., Carvalho, E. (2002). IgG Anti-IgE Autoantibodies in Visceral Leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 101-103.
- Abraira, V. (2000). El índice kappa. SEMERGEN, 247-249.
- Agudelo Lopez, S. d., Robledo Restrepo, M. (2000). Respuesta Inmune en Infecciones Humanas por Leishmania spp. Latreia, Latreia, 167-178.
- Ampuero, J. (2005). Factores de riesgo para la transmisión de leishmaniasis cutánea en niños de 0 a 5 años en un área endémica v. Cad. Saúde Pública, 161-170.
- Atta, A. (1998). Anti-Leishmanial IgE Antibodies: A Marker of active disease in visceral Leishmaniasis. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 426-430.
- Bensoussan, E., Nasereddin, A. (2006). Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. Journal of Clinical Microbiology, 1435-1439.
- Choquehuanca, Jose Luis. (2011). Estandarización de pruebas de ELISA de tipo indirecto para la determinación de los niveles de anticuerpos IgG e IgE anti-Leishmania, como metodo complementario para el diagnostico.
- Conjivaram Vidyashankar, M. (2009). Leishmaniasis. Medscape.
- Corning, I. (2001). Effective Blocking Procedures. Nueva York, Estados Unidos.
- Dias Costa, J. (2007). Leishmania chagasi: Cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells . Experimental Parasitology, 390-398.
- Henao, H. H. (2004). Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. Biomedica, 303-402.

- Hernández Ruiz, J. (2006). Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud pública de México*, 430-439.
- Ibañez, S. (2008). Evaluación de la flora en el valle de zongo contra leishmania y chagas. *revista Boliviana de química*, 43.
- Iniesta, L. (2007). Diagnóstico de la Leishmaniosis críptica en el perro. Expresión Isotípica e Idiopática de los anticuerpos producidos en distintas fases de la infección. Barcelona, España.
- Iñiguez, S. R. (2004). Leishmaniosis visceral en el criceto dorado. Madrid, Madrid, España.
- Isabel, N. H. (1999). Eosinofilia y parasitosis. *Revista Chilena de pediatría*, 435-440.
- Khairul, A. (1999). Differential Decline in Leishmania Membrane Antigen-Specific Immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG Subclass Antibodies in Indian Kala-Azar Patients after Chemotherapy. *Infection and Immunity*, 6663-6669.
- Kouris, E., Calebotta, A., González, F. (2005). Eosinófilos: su rol en la patología dermatológica severa. *Dermatología Venezolana*, 8-16.
- Llanos Medina, F., Espinoza, B. (2009). Extracción acuosa de corteza de Galipea longiflora y su actividad leishmanicida. *Biofarbo*, 32-38.
- Manual de diagnóstico y tratamiento de la leishmaniosis. (2011). Asunción, Asunción, Paraguay.
- Martínez Salazar, B. (2008). El ADN de Leishmania mexicana activa al macrófago murino e induce aumento en la expresión de TLR9. *Medigraphic*, 99-104.
- McFarlane, E. (2008). Neutrophils Contribute to Development of a Protective Immune Response during Onset of Infection with Leishmania donovani. *Infection and Immunity*, 532-541.
- Mollinedo, S. (2010). leishmaniasis en bolivia, epidemiología de fin de siglo. la paz, la paz, bolivia.
- Mollinedo, S., Monasterios, H. (2007). Leishmaniasis, Guía operativa para el control en Bolivia. La Paz, La Paz, Bolivia.
- Montoya, I., Padilla, C. (1997). Diagnóstico molecular para Leishmaniasis. *Revista Medica*, 25-28.
- Mossalayi, M., Arock, M. (1999). The Human Immune Response during Cutaneous Leishmaniasis: No Problem. *Parasitology Today*, 342-345.
- Oddone, R. Canese, A. (2005). Leishmaniasis tegumentaria: sensibilidad de la inmunofluorescencia indirecta en pacientes con diagnóstico parasitológico. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Paraguay*, 15-18.
- OPS; OMS. (2007). Sistema regional de datos básicos en salud - perfil de país resumen del análisis de situación y tendencias de salud bolivia. La Paz, La Paz.
- Padron, M., Diaz, A. (2007). Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en Leishmania Academia Biomédica Digital, Fac. Medicina, Universidad Central de Venezuela, Octubre-Diciembre 2007;33. *Vitae*.
- Paraguay, Ministerio de Salud. (2011). Manual de Diagnóstico y Tratamiento de la Leishmaniosis.
- Parreira de Arruda, M. S., & Salles Nogueira, M. E. (2002). Histological evaluation of the lesion induced by inoculation of Leishmania mexicana in the cheek pouch of the hamster. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 203-297.
- Péterfia, Z., Kocsisa, B. (2008). Comparison of Blocking Agents for an Elisa for Lps. *Journal of Immunoassay*, 341-354.
- Pearce, R. (2007). Comparison of Blocking Agents for ELISA. Cambridge Research Laboratories, England. Technical Bulletin.
- Reithinger, R. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 581-596.
- Riera, M., Gállego, C. (s.f.). Las Leishmaniosis Humanas: Leishmaniosis autoctona por Leishmania infantum. Barcelona, España.
- Ruiz, J. H. (2007). CD 8 Cytotoxic T cells in Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite immunology*, 671-678.
- Salud, Ministerio. (2012). Situación epidemiología de la Leishmaniasis. *Memorias de Epidemiología*.
- Salud, Organización Mundial (2010). Control de la Leishmaniasis.
- Salud, Organización Panamericana (2013). Leishmaniasis en las Américas. Recomendaciones para el tratamiento.
- Silveira, F., Lainson, R., Corbett, C., (2004). Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 239-251.
- Sousa, A. Araujo, M. (1999). Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1101-1105.
- Sousa, M.A.; Da Silva, A.; Alfonso-Cardoso, S., (2005) Perfil de isotipos de inmunoglobulinas e subclases de IgG na leishmaniose tegumentar americana, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 137-141.
- Vouldoukis, I., Issaly, F. (1994). CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: Possible role in monocyte activation. *Research in Immunology*, 17-27.
- Zanger, P., Kötter, I., Krensmirner, P. and Gabrysch, S., (2011). Tumor necrosis factor alpha antagonist drugs and leishmaniasis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*
- Zerpa, O., Borges, R. (2002). Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. *Dermatología Venezolana*, 106-110.