



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



**ESTANDARIZACIÓN 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
DE LA ENFERMEDAD**

ELABORADO POR:

Univ. JOSÉ LUIS CHOQUEHUANCA QUISPE

(TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA)

LA PAZ Ë BOLIVIA

2011



UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIOS
DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIÓN EN SALUD (SELADIS)



**ESTANDARIZACIÓN 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
DE LA ENFERMEDAD**

ELABORADO POR:

Univ. JOSÉ LUIS CHOQUEHUANCA QUISPE

ASESOR:

Dr: LUIS FERNANDO SOSA TORDOYA SP. EN INMUNOLOGÍA
LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD E INMUNOGENÉTICA
INSTITUTO SELADIS.

(TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA)

LA PAZ Ë BOLIVIA

2011

DEDICATORIA

A mis queridos padres Benjamín y Sabina por creer en mí y ayudarme a crecer, con todo su amor y apoyo incondicional.

A mi familia Lidia, Milton, Delia, Marco, Braulio, Sofía por su aprecio y apoyo.

En especial a Luis Héctor aquel que se ha convertido en el motor que me da la energía suficiente para seguir adelante día a día ñ ñ mi amado hijo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida, sabiduría, fuerza y el tiempo prestado para lograr mis objetivos y todas sus bendiciones.

Agradecer a toda mi familia, que siempre me dio su apoyo, amor, confianza y esfuerzo para alcanzar mis objetivos y ser una persona de bien.

Un agradecimiento especial a mi asesor, Dr. Luis Fernando Sosa T. por todo su tiempo, dedicación, consejos, enseñanzas, por su amistad, por compartir sus conocimientos y por el esfuerzo que emplea en formar nuevos profesionales aptos para la sociedad.

A los doctores Katuska Gonzales, José Antonio Santalla, Grace Ruiz, Jacqueline Calla, por la predisposición y colaboración tanto intelectual como material sin la cual, la realización de este trabajo no hubiera sido posible.

A mis amigos y compañeros de trabajo Dra. Viviana Peláez, Dra. Elizabeth Alcalá, Dra. Ana Cruz, Diego Bonifaz, Lorena Riveros, Raquel I. Rosa, que siempre estuvieron ahí para apoyarme incondicionalmente, por su amistad y colaboración brindada.

A mi querida UMSA, a mi Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas y mi querido instituto SELADIS y todo su personal, por acogerme todo este tiempo de formación profesional y ser parte de su historia

CONTENIDO

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
CONTENIDO	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO	6
a. Leishmaniasis	6
b. Ciclo biológico.....	7
c. Epidemiología	10
d. Fisiopatología de la enfermedad.....	11
e. Aspectos inmunológicos	14
f. Diagnóstico.....	16
i. Frotis de lesión.....	17
ii. Cultivo de parásitos	17
iii. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	18
iv. Intradermorreacción de Montenegro (IDRM).....	18
v. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	19
vi. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	19
g. Tratamiento	20
i. Antimoniales pentavalentes.....	20
ii. Anfotericina B	21
III. ANTECEDENTES.....	22
IV. JUSTIFICACIÓN.....	23
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
VI. OBJETIVOS	26
a. Objetivo general.....	26
b. Objetivos específicos	26
VII. DISEÑO METODOLÓGICO.....	27

a.	Tipo de estudio	27
b.	Población en estudio.....	27
VIII.	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	27
a.	Tamaño de la muestra	27
b.	Sueros control positivo.....	28
c.	Sueros control negativo	28
d.	Aspectos éticos.....	28
IX.	CONTEXTO Y LUGAR	28
X.	MATERIAL Y MÉTODOS	29
a.	Materiales	29
i.	Material de vidrio y plástico	29
ii.	Equipos	29
iii.	Reactivos.....	30
b.	Métodos.....	30
i.	Cultivo de Parásitos	30
ii.	Obtención del antígeno soluble de <i>Leishmania</i> (ASL).....	31
iii.	Preparación de las placas de microtitulación de ELISA con ASL.....	33
iv.	Estandarización de la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos IgG anti- <i>Leishmania</i>	34
v.	Estandarización de la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos IgE anti- <i>Leishmania</i>	37
vi.	Determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados	39
vii.	Determinación de la repetitividad del estudio.....	40
viii.	Determinación de la correlación de resultados del ELISA IgG estandarizado frente a los resultados de un ELISA comercial que mide anticuerpos anti-IgG anti- <i>Leishmania</i>	41
XI.	RESULTADOS	43
a.	Obtención del antígeno soluble de <i>Leishmania</i> (ASL).....	43
b.	Estandarización de las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos tipo IgG anti- <i>Leishmania</i>	45
i.	Tapizado de las microplacas de ELISA	50
ii.	Titulación del anticuerpo anti- <i>Leishmania</i> y del conjugado para la técnica ELISA.....	51
c.	Estandarización de las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos tipo IgE anti- <i>Leishmania</i>	60
i.	Pre-tratamiento de los sueros para la eliminación de interferencia por Ac tipo IgG.	60

ii.	Determinación de las diluciones óptimas de la muestra y del conjugado para la determinación de anticuerpos IgE anti- <i>Leishmania</i> por ELISA indirecto.	61
d.	Determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados.	64
i.	Determinación de la línea de corte con muestras negativas para el ELISA IgG anti- <i>Leishmania</i>	65
ii.	Determinación de la línea de corte con muestras negativas para el ELISA IgE anti- <i>Leishmania</i>	67
e.	Determinación de la repetitividad de resultados del estudio.....	69
f.	Determinación de la correlación de resultados del ELISA IgG estandarizado frente a otro método de ELISA comercial r-biopharm®.....	70
XII.	DISCUSIÓN.....	72
a.	Obtención del antígeno soluble de <i>Leishmania</i> (ASL).....	72
b.	Optimización de las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos tipo IgG anti- <i>Leishmania braziliensis</i>	74
i.	Tapizado de las microplacas de ELISA	74
ii.	Titulación del anticuerpo anti- <i>Leishmania braziliensis</i> y del conjugado anti IgG humano marcado con peroxidasa para la técnica ELISA.....	75
c.	Optimización de las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos tipo IgE anti- <i>Leishmania brasiliensis</i>	78
i.	Pre-tratamiento de los sueros para la eliminación de interferencia por Ac tipo IgG.	78
d.	Determinación de las diluciones óptimas de la muestra y del conjugado para la determinación de anticuerpos IgE anti- <i>Leishmania braziliensis</i> por ELISA indirecto. ...	79
e.	Determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados.	80
i.	Determinación de la línea de corte con muestras negativas para el ELISA IgG anti- <i>Leishmania</i>	80
ii.	Determinación de la línea de corte con muestras negativas para el ELISA IgE anti- <i>Leishmania</i>	81
f.	Determinación de la repetitividad de los resultados del estudio	82
g.	Determinación de la correlación de resultados del ELISA IgG estandarizado frente a otro método de ELISA comercial.....	82
h.	Costos del kit casero.....	84
XIII.	CONCLUSIONES.....	85
XIV.	RECOMENDACIONES.....	87
XV.	BIBLIOGRAFIA.....	88
ANEXOS		

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Nº1 Insecto vector del parásito de <i>Leishmania</i>	4
Figura Nº 2 estadios del parásito de <i>Leishmania</i>	8
Figura Nº3 ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	9
Figura Nº4 Distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea	10
Figura Nº5 Lesión cutánea producida por <i>leishmania braziliensis</i>	13
Figura Nº6 Cultivo de parásitos.....	31
Figura Nº7 Sonicación directa de los promastigotes	32
de <i>Leishmania braziliensis</i>	32
Figura Nº8 Sembrado del ASL para la fijación del antígeno por 18 horas a 4°C.	33
Figura Nº9 Adición de los sueros a las diluciones.....	35
establecidas para su evaluación	35
Figura Nº10 Fase de pre-tratamiento de los sueros para la eliminación de IgG interferente, incubación por 1 hora a 26 °C en agitación suave a 250 rpm (Microtube thermal mixer) ..	37
Figura Nº11 Placas de ELISA con la reacción colorimétrica obtenida al procesar 50.....	40
muestras negativas para evaluar los dos tipos de anticuerpos IgG e IgE.....	40
Figura Nº12. Placa de micropozos con las 15 muestras positivas evaluadas.....	41
con el ELISA IgG estandarizado, con 1 control positivo y dos.....	41
controles negativos.....	41

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N°1. Relación entre las densidades ópticas (DO) y las concentraciones de proteínas obtenidas de ASL a partir de cultivos de promastigotes.	45
Gráfica N°2. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 30 min, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 1 y a una dilución del conjugado 1:100	52
Gráfica N° 3. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 2 y a una dilución del conjugado 1:100	53
Gráfica N°4. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 1 hora y sustrato 30 min del protocolo N° 3 y a una dilución del conjugado 1:100	54
Gráfica N°5. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 2 horas, conjugado 1 hora y sustrato 30 min del protocolo N° 4 y a una dilución del conjugado 1:100	55
Gráfica N°6. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 30 min, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 1 y a una dilución del conjugado 1:500	56
Gráfica N°7. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 2 y a una dilución del conjugado 1:500	57
Gráfica N°8. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 1 hora y sustrato 30 min del protocolo N° 3 y a una dilución del conjugado 1:500	58
Gráfica N°9. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 2 hora, conjugado 1 hora y sustrato 30 min del protocolo N° 4 y a una dilución del conjugado 1:500	59
Gráfica N°10. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 2 y a una dilución del conjugado 1:100	63

Gráfica N°11. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti- <i>Leishmania braziliensis</i> utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 2 y a una dilución del conjugado 1:500	64
Gráfica N°12. Determinación de la línea de corte del ELISA IgG anti- <i>Leishmania braziliensis</i> estandarizada procesando 50 muestras negativas.....	65
Gráfica N°13. Determinación de la línea de corte de la prueba de ELISA IgG anti- <i>Leishmania braziliensis</i> estandarizada, procesando 10 muestras negativas y 15 muestras positivas (como control de calidad).....	66
Gráfica N°14. Determinación de la línea de corte del ELISA IgE anti- <i>Leishmania braziliensis</i> estandarizada, procesando 50 muestras negativas.	67
Gráfica N°15. Determinación de la línea de corte de la prueba de ELISA IgE anti- <i>Leishmania braziliensis</i> estandarizado, procesando 10 muestras negativas y 15 muestras positivas (como control de calidad).....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nº 1. Condiciones de trabajo para el tapizado y el postapizado de las microplacas.	34
Tabla Nº2. Protocolos de trabajo evaluados para la estandarización de la técnica ELISA IgG anti- <i>Leishmania braziliensis</i> .	36
Tabla Nº3. Protocolo de trabajo para la determinación de anticuerpos IgE Anti- <i>Leishmania</i>	39
Tabla Nº4. Concentración de proteínas obtenidas (ASL) por el método de sonicación a partir de diferentes concentraciones de cultivo de promastigotes	44
Tabla 5. Densidades ópticas obtenidas al analizar el sueros control positivo y negativo utilizando el ASL obtenido a partir de los dos protocolos evaluados	44
Tabla Nº 6. Esquema general de los experimentos realizados y resultados del promedio de densidad óptica obtenidos para la determinación de la concentración de ASL, dilución de sueros y conjugados anti-IgG humano ideales para determinar resultados positivos y negativos en base a la presencia o ausencia de anticuerpos de tipo IgG anti- <i>Leishmania</i> .	46
Tabla Nº 6-A. Protocolo de trabajo Nº 1.	46
Tabla Nº 6-B. Protocolo de trabajo Nº 2.	47
Tabla Nº 6-C. Protocolo de trabajo Nº 3.	48
Tabla Nº 6-D. Protocolo de trabajo Nº 4.	49
Tabla Nº7. Valores promedio de las densidades ópticas obtenidas en el postapizado de los micropozos con los dos tampones de postapizado utilizados en una prueba de ELISA.	50
Tabla Nº 8. Resultados de las concentraciones y tiempos ideales de los reactantes utilizados durante la estandarización de la técnica de ELISA indirecto que mide anticuerpos IgG anti- <i>Leishmania</i> .	60
Tabla Nº 9. Densidades ópticas de los sueros pre-tratados con anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgG humano y PEG al 12,5% y sueros sin tratar obtenidas en el experimento previo a la estandarización del ELISA IgE anti- <i>Leishmania</i> .	61
Tabla Nº 10. Esquema de los experimentos realizados para la determinación de la concentración de ASL, dilución de sueros y conjugados anti-IgE humano ideales para la determinación de anticuerpos tipo IgE anti- <i>Leishmania</i> .	62
Tabla Nº11. Resultados de las densidades ópticas obtenidas de los cinco análisis realizados a los mismos sueros control positivo y negativo a diferentes tiempos.	69
Tabla Nº12. Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA estandarizada frente al ELISA comercial r. biopharm® (Ver anexo 10).	70
Tabla Nº 13. Resultados de las densidades ópticas obtenidas por los dos ELISAs evaluados.	71

ABREVIATURAS

- ASL:** Antígeno soluble de *Leishmania*
- BSA:** Bovine Seric Albumin (Albúmina Sérica Bovina)
- DO:** Densidad Óptica
- ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas)
- EPD:** Exámen parasitológico directo
- FR:** Factor reumatoideo
- IFN:** Interferón
- IL:** Interleucina
- LC:** Leishmaniasis Cutánea
- LCD:** Leishmaniasis Cutánea Difusa
- LCL:** Leishmaniasis Cutánea Localizada
- LMC:** Leishmaniasis Mucocutánea
- LPG:** Lipofosfoglicano
- LPMN:** Linfocitos polimorfonucleares
- LPS:** Lipopolisacárido
- LV:** Leishmaniasis Visceral
- NK:** Células Natural Killer
- NO:** Óxido Nítrico
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- OPD:** O-Phenilendiamine (O-fenilendiamina)
- PAMP:** Patrones moleculares asociados a patógenos
- PBS:** Phosphate Buffered Saline (tampón fosfato salino)
- PCR:** Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
- SBF:** Suero Bovino Fetal
- SSF:** Solución salina fisiológica
- TLR:** (toll like receptors).

RESUMEN:

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad caracterizada por la inducción de una respuesta tipo Th2 caracterizada por la producción de respuesta inmune humoral, siendo los niveles de anticuerpos IgG e IgE indicadores de diagnóstico, progresión y resolución de la infección. En el presente estudio se han estandarizado dos técnicas de ELISA tipo indirecto, para determinar los niveles de anticuerpos IgG e IgE contra antígeno soluble de *Leishmania braziliensis*. Para determinar los niveles de anticuerpos IgG e IgE-anti-*Leishmania* se obtuvo antígeno soluble de *Leishmania* (ASL) de promastigotes de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) en fase estacionaria de crecimiento por sonicación directa y centrifugación a 6800 rpm/15min, obteniendo una concentración ideal para tapizar los micropozos Greiner bio-one (CELLSTAR®) de 10µg/ml para el ELISA IgG y 20µg/ml para el ELISA IgE en tampón carbonatos 0.1 M pH 9.6 por 18 horas/4°C. El exceso de sitios reactivos fue bloqueado con PBS-BSA 0,1% por 1 hora/temperatura ambiente; la dilución del suero utilizada fue de 1/21 en tampón fosfatos 0,01 M, pH 7.4 para ambos casos. En el caso del ELISA IgE, se hizo un pre-tratamiento del suero con 25 µl de una solución de anticuerpos anti-IgG humano a una dilución de 1/500 en solución salina fisiológica y 60 µl de polietilenglicol al 12,5 % (PEG) se mezcló bien y se dejó en incubación por 30 minutos a 37 °C, se centrifugaron los tubos a 3500 rpm/15min y se trabajó con el sobrenadante; la dilución del conjugado (anticuerpos monoclonales anti-IgG; anti-IgE humano conjugados con peroxidasa) fue 1/500 para el ELISA IgG y 1/100 para el ELISA IgE en PBS. Tween 20 0,05% . BSA 0,1 % en ambos casos se utilizó O-fenildiamina como sustrato a 2,2 mg/ml en tampón citrato-fosfato 0,05 M pH 5, se utilizó H₂SO₄ 3N como solución de parada, la absorbancia fue leída a 490-630 nm en un lector de ELISA (Bio-teck Instruments Inc, USA). Las densidades ópticas del ELISA IgG estandarizado fueron ($\bar{x}DO \pm DS$)=1,154 ± 0,240 para los controles positivos y 0,227 ± 0,013 para los negativos, con un coeficiente de variación CV de 0,208 y 0,057 (P<0,05) respectivamente, la línea de corte fue = 0,276. La eliminación del IgG interferente con PEG 12,5% redujo un 61,93% la DO para los controles positivos y en 32% para los negativos. El ELISA IgE estandarizado tuvo DO ($\bar{x}DO \pm DS$) 0,434 ± 0,018 para los controles positivos y 0,089 ± 0,005 para los negativos, con coeficiente de variación CV de 0,041 y 0,056 (P<0,05) respectivamente, la línea de corte fue =0,173. En el ELISA IgG se tuvo un 100% de correlación de resultados positivos (S = 100%) y negativos (E = 100%) frente a un ELISA comercial r-Biopharm®, con un índice de correlación de *Kappa* de 1 (p< 0,05), que equivale a una muy buena correlación de resultados entre los dos métodos en estudio. Los resultados obtenidos de la estandarización de ambas técnicas de ELISA, muestran que pueden ser utilizados como herramienta de diagnóstico y seguimiento terapéutico de los pacientes con leishmaniasis. Sin embargo es necesario continuar con los estudios para validar estos procedimientos y determinar las posibles reacciones cruzadas que puedan tener ambos ELISAs.

SUMMARY:

Cutaneous leishmaniasis is a disease characterized by the induction of a Th2 response, characterized by production of a humoral immune response, being the IgG and IgE levels diagnostic, progression and resolution indicators of infection. In the present study two indirect ELISA to determine IgG and IgE antibodies levels of against soluble antigen of *Leishmania braziliensis* were standardized. To determine the levels of IgG and IgE-anti-*Leishmania* the soluble antigen (ASL) was obtained from *Leishmania L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) promastigotes, seeded in stationary growth phase by direct sonication and centrifugation at 6800 rpm/15min, obtaining a ideal concentration for covering the microwells Greiner bio-one (CellStar®) of 10 µg / ml for the ELISA IgG and 20 µg/ml for the ELISA IgE both in 0.1 M carbonate buffer pH 9.6 for 18 hours / 4 ° C. The excess reactive sites were blocked with PBS- BSA 0.1% for 1 hour at room temperature, the serum dilution used was 1/21 in 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 for both cases. In the case of the IgE ELISA, a pretreatment of serum with 25 µl of a solution of anti-human IgG diluted 1/500 in physiological saline solution and 60 µl of 12.5% polyethylene glycol (PEG) was performed, it was mixed well and allowed incubating for 30 minutes at 37 ° C. The tubes were centrifuged at 3500 rpm/15min and worked with the supernatant, the dilution of conjugate (anti-IgG monoclonal antibodies, anti-human IgE conjugated to peroxidase) used was 1/500 for ELISA IgG and 1/100 for IgE ELISA in PBS-Tween 20 0.05% - 0.1% BSA was used both as substrate O-phenyldiamine to 2.2 mg/ml in citrate-phosphate buffer 0.05 M pH 5. A solution of H₂SO₄ 3N was used as stop solution, the absorbance was read at 490-630 nm of wave long in an ELISA reader (Bio-teck Instruments Inc, USA). The optical densities were standardized IgG ELISA (OD ± SD) 1.154 ± 0.240 for positive and 0.227 ± 0.013 for the negative control serun, with a coefficient of variation (CV) of 0.208 and 0.057 (P <0.05) respectively, the cut off found was 0.276. The elimination of IgG interfering with PEG 12.5% decreased in 61.93% of Optical density (OD) for positive control and 32% for negative. The standardized IgE ELISA has a Optical density (OD) (OD ± SD) 0.434 ± 0.018 for positive control and 0.089 ± 0.005 for negative control, with a coefficient of variation CV of 0.041 and 0.056 (P <0.05) respectively, the determined cut-off was 0.173. The IgG ELISA showed a 100% correlation of positive results (S=100%) and negative (E=100%) results compared to another commercial ELISA® r-Biopharm, with a correlation Kappa index of 1 (p < 0.05), that is equivalent to a very good correlation of results between the two methods under study. The standardization results of both ELISAs show that can be used as a diagnostic and therapeutic tool for monitoring patients with leishmaniasis. However, it is necessary to continue studies to validate these procedures and to identify potential cross-reactions that would have both ELISAs.

I. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias producidas por protozoos flagelados del género *Leishmania* que infecta principalmente a macrófagos del hospedero, y otras células como neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y fibroblastos. Además del hombre, una amplia variedad de mamíferos silvestres y domésticos, tales como el perro, roedores y marsupiales, se han logrado identificar como hospedadores de las especies de *Leishmania*. Su transmisión en la naturaleza se produce por la picadura infectante del vector hembra de un grupo de insectos dípteros, de la familia *phlebotomidae*, (el flebótomo) en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo. En el nuevo mundo, los agentes etiológicos de esta enfermedad son: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (L) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (V) guyanensis*, *Leishmania (V) peruviana*, *Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania chagasi*, *Leishmania infantum (chagasi)* siendo ésta última potencialmente fatal⁽¹⁾.

Las leishmaniasis representan un serio problema de salud, con alrededor de 12 millones de casos a nivel mundial. Amenaza a 350 millones de mujeres, hombres y niños en 88 países del mundo, de los cuales 72 se encuentran en vías de desarrollo⁽³⁾. En humanos, la leishmaniasis visceral causa parasitismo y patología importante en hígado, bazo y médula ósea y el 90% de la leishmaniasis visceral se dan en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudan. Según la OMS se estima que el 90,0% de los casos de leishmaniasis muco cutánea se presentan en Brasil, Bolivia y Perú; el 90,0% de los casos de leishmaniasis cutánea se encuentran en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria^(2,9).

En Bolivia, aproximadamente 800,000 personas están en alto riesgo de infectarse⁽¹⁾ y se han reportado 2438 casos de leishmaniasis con una incidencia de 37.3%^(1,4).

Los parásitos asociados con leishmaniasis en nuestro país son: *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. chagasi* y *L. guyanensis*. Las regiones endémicas de estas especies de *leishmania* son La Paz, Cochabamba, Santa Cruz, Beni, Pando y Tarija.

En Bolivia hasta la fecha se han descrito más de 120 especies de vectores de leishmaniasis, de las cuales 38 tienen hábito antropofílico, habiéndose comprobado a 7 especies como vectores de la enfermedad⁽⁴⁾ siendo estas *Lutzomyia longipalpis* (La Paz y Santa Cruz), *Lutzomyia yucumensis* (La Paz, Beni y Pando), *Lutzomyia llanosmartinsi* (La Paz, Beni, Pando y Cochabamba), *Lutzomyia carrerai carrerai* (La Paz, Beni, Pando y Santa Cruz), *Lutzomyia nuneztovari anglesi* (La Paz), *Lutzomyia neivai* (Tarija) y *Lutzomyia shawi* (Isiboro Sécuré . Cochabamba).



Figura Nº1 Insecto vector del parásito de *Leishmania*.

Disponible en <http://buscaterapias.cl/que-es-la-leishmaniasis/>

La defensa del organismo infectado con *Leishmania* involucra la inmunidad tanto de tipo celular como de tipo humoral. En la respuesta celular intervienen los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y linfocitos T. Destacándose el papel de los macrófagos en la destrucción del parásito y el control de crecimiento del mismo debido a la producción de factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) temprana dirigido a la activación de los macrófagos. La producción y acumulación de eosinófilos implica la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas, la interacción con las células endoteliales, la quimiotaxis, activación celular y el balance entre la supervivencia y apoptosis del eosinófilo. Varios estudios han observado que los valores de este tipo celular se encuentran aumentados antes y durante el tratamiento con los fármacos de primera línea como el Glucantime®⁽³²⁾, sin embargo, estos valores disminuyen después del tratamiento. La respuesta humoral está mediada principalmente por anticuerpos específicos contra *Leishmania* como la IgG, IgE secretadas vía citoquinas producidas por la

interacción de Linfocitos B con Linfocitos T. Estas inmunoglobulinas tienen diferentes funciones dentro la defensa inmunitaria como son la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), activación del complemento por la vía clásica y alterna, la regulación de linfocitos B y la opsonización de promastigotes para su unión a sus receptores correspondientes y posterior fagocitosis mediada principalmente por los macrófagos.

El tratamiento de elección contra la leishmaniasis continúa siendo las inyecciones intramusculares diarias de antimoniales pentavalentes como el Glucantime®, el cual es considerado como medicamento de primera línea, contra Leishmaniasis. Sin embargo, no hay estudios *in vivo* que comparen su eficacia terapéutica y toxicidad, controlando variables sobre todo inmunológicas del hospedero⁽⁵⁾.

En los casos más severos en lesiones mucosas, como tratamiento, se emplea la Anfotericina B, sin embargo en la actualidad, existe un creciente número de reportes de cepas resistentes a estas drogas⁽¹⁾ y se está haciendo énfasis en la búsqueda de terapias alternativas al tratamiento anti-*leishmania*.

Si bien los pacientes tratados sea con medicamentos de primera línea, segunda línea, o en base de productos naturales, muestran una cura clínica de la enfermedad, los métodos de laboratorio como ser Frotis de lesión, Intradermoreacción de Montenegro (IDRM), Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizados para el diagnóstico de la enfermedad, no son lo suficientemente precisos para determinar si el paciente hizo o no cura parasitológica de la misma. Es por eso que planteamos estandarizar dos pruebas de ELISA tipo indirecto, para determinar los niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgE anti- *Leishmania*, que sean capaces de identificar a estos dos tipos de anticuerpos como marcadores de diagnóstico y respuesta al tratamiento, como valor pronóstico favorable o no en la resolución de la enfermedad, brindando al clínico una herramienta más de apoyo que le permita tomar decisiones oportunas referidas al tratamiento y control de pacientes con leishmaniasis.

II. MARCO TEÓRICO

a. Leishmaniasis

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por parásitos protozoarios dimórficos flagelados, que pertenece al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae del género *Leishmania* que infectan principalmente a macrófagos del mamífero hospedero⁽⁶⁾. Esta enfermedad produce diferentes manifestaciones clínicas, desde úlceras cutáneas hasta destrucción masiva del tejido que puede causar la muerte. Las manifestaciones clínicas dependen tanto de la respuesta inmune del hospedero como de la especie de *Leishmania* infectante.

Morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad que producen y distribución geográfica. Las dos formas morfológicas principales de leishmania son, la intracelular o amastigote, que se localiza en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado, y la forma extracelular o promastigote localizada en el tracto intestinal del vector invertebrado.

El género *Leishmania* comprende dos grandes subgéneros: *Viannia* y *Leishmania*, que comprenden varias especies patógenas para el hombre, siendo las más importantes las siguientes;

- Subgénero *Viannia*:
 - Complejo *Leishmania Viannia (LV) braziliensis*
 - *Leishmania braziliensis*
 - *Leishmania guyanensis*
 - *Leishmania panamensis*
 - *Leishmania peruviana*
- Subgénero *Leishmania*:
 - Complejo *Leishmania Leishmania (LL) mexicana*
 - *Leishmania mexicana*
 - *Leishmania amazonensis*
 - *Leishmania venezuelensis*
 - *Leishmania tropica* (en el viejo mundo)

- *Leishmania major* (en el viejo mundo)
- *Leishmania aethiopica* (en el viejo mundo)
- Complejo *Leishmania Leishmania (LL) donovani*:
 - *Leishmania donovani*
 - *Leishmania infantum*
 - *Leishmania chagasi*

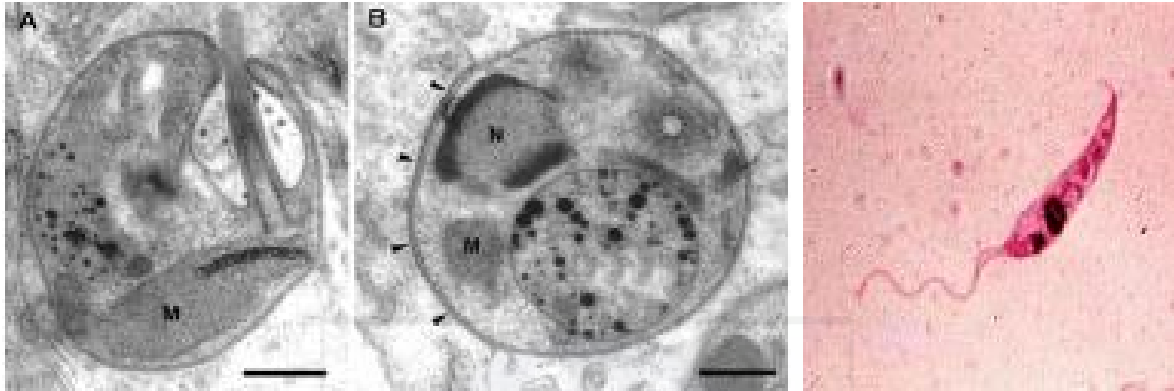
El tropismo habitual de las especies de *Leishmania* se da de la siguiente manera:

- Leishmaniasis visceral (LV) o Kala-azar: causado por las especies del complejo *LL donovani*.
- Leishmaniasis cutánea (LC): causado por las especies de los complejos *LV braziliensis* y *LL mexicana*.
- Leishmaniasis cutánea difusa (LCD): causada por *LL. aethiopica*.
- Leishmaniasis mucocutánea (LMC): producida exclusivamente por *LV. braziliensis*.

b. Ciclo biológico

El ciclo biológico del parásito *Leishmania* es asexual y heteroxeno, comprende el paso alternativo entre la forma de amastigote, que se localiza en las células del sistema fagocítico mononuclear del mamífero hospedador y la forma de promastigote, que parasita al vector invertebrado.

En los tejidos del huésped (hombre, canidos, roedores), los parásitos se encuentran en forma de amastigote con una morfología ovalada o redondeada, es inmóvil y mide entre 2 a 3 micras de diámetro. El núcleo es voluminoso, esférico y generalmente excéntrico. Próximo al núcleo se encuentra el kinetoplasto, una estructura mitocondrial especializada que contiene ADN extracelular. El kinetoplasto tiene forma bacilar y está asociado a un flagelo rudimentario que no se extiende fuera del parásito, por lo que es poco visible y se le conoce como rizoplasto. Estos son captados por los macrófagos de piel y tejido celular subcutáneo, donde se reproducen intracelularmente por fisión binaria hasta que provocan el estallido celular y pasan a parasitar nuevas células^(8,3).



A,B: amastigote de *Leishmania*. (N) núcleo, (M) mitocondria, (f) flagelo rudimentario.
C: promastigote de *Leishmania*. (N) núcleo, (K) kinetoplasto, (F) flagelo.

Figura Nº 2 estadios del parásito de *Leishmania*.

Adaptado de A.C. Gonzales, *Búsqueda de genes que codifican proteínas útiles para la inmunoprotección frente a leishmaniasis*.

Al picar la hembra vector en la piel del vertebrado, se forma una lesión con sangre y macrófagos de la dermis en donde están los parásitos, este material es succionado y llega a la luz del tubo digestivo del mosquito; allí los parásitos se alargan, desarrollan rápidamente el flagelo y constituyen las formas móviles o promastigotes, de forma alargada, que presenta una longitud de aproximadamente 20 micras. Tiene un núcleo central oval, un kinetoplasto terminal o subterminal y en la parte anterior del parásito, se origina un flagelo, casi de igual longitud que el cuerpo. Cuando los estadios intermedios llegan a promastigotes metacíclicos migran hacia la probóscide del vector y son inoculados cuando éstos intentan tomar sus alimentos⁽⁸⁾.

Existe predilección de ciertas especies de *Leishmania* para reproducirse en diferentes partes del tubo digestivo del vector, lo cual ha dado lugar a una clasificación en 3 grupos: *Hypopyloria* en la parte posterior del tubo digestivo, *Suprapyloria* en la anterior y *Perípyloria* en ambas partes. La reproducción también se hace por división binaria. Los promastigotes infectantes migran a la parte anterior del insecto desde el intestino a la faringe y trompa del mosquito hasta que son inoculados al comienzo de la picadura, a un nuevo huésped, éstos son captados por los macrófagos de piel y tejido celular subcutáneo y pueden alcanzar las mucosas como ocurre con *L. braziliensis*, o macrófagos de bazo, hígado,

médula ósea y ganglios linfáticos como en el caso de *L. donovani* o *L. infantum* (8,9,13).

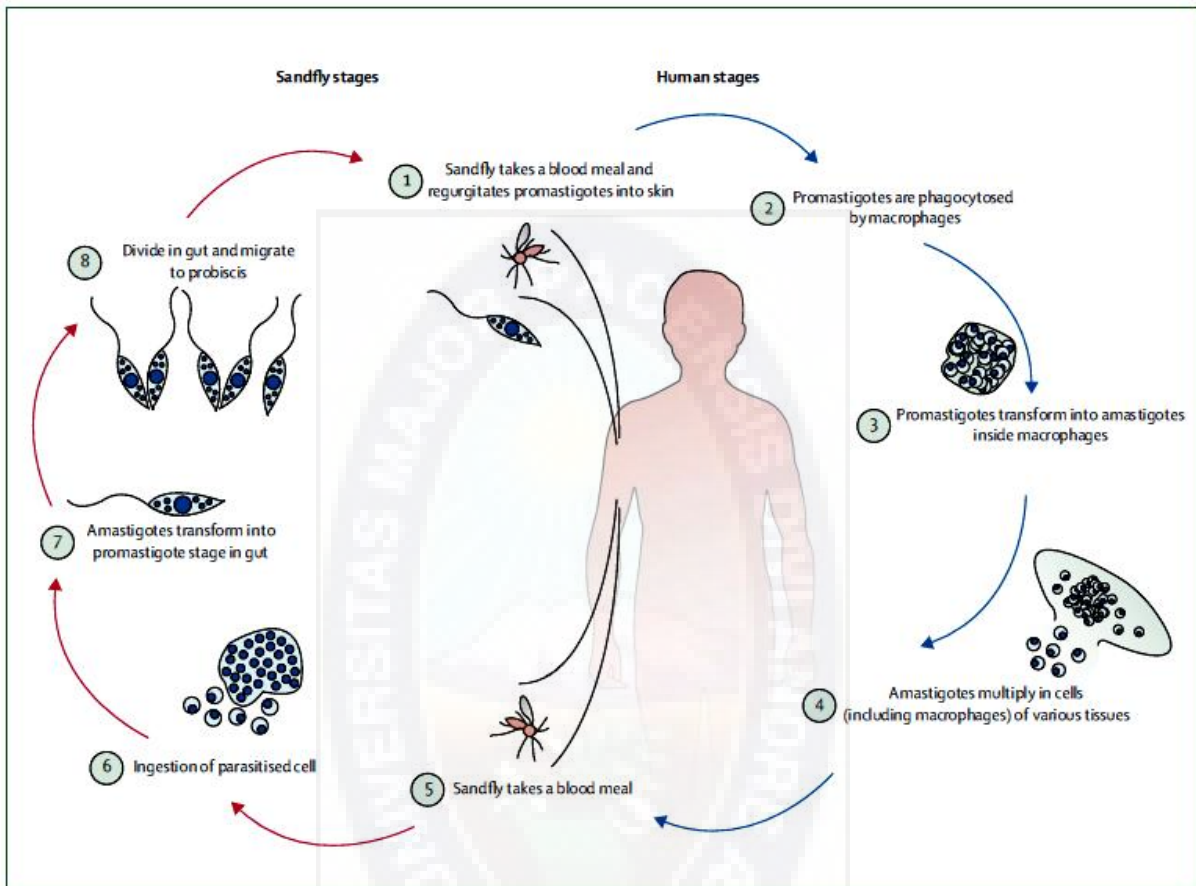


Figura Nº3 ciclo biológico de *Leishmania*.

Al picar a sus hospederos, los mosquitos infectados regurgitan promastigotes de *Leishmania* en la piel (1), que invaden o son fagocitados por las células locales, principalmente macrófagos (2). Dentro de los fagolisosomas de los macrófagos residentes, los promastigotes se transforman a amastigotes (3). Los amastigotes se replican y luego pueden infectar a los macrófagos adicionales, ya sea localmente o en tejidos distantes después de la difusión (4). Cuando los mosquitos se alimentan de la sangre de un huésped infectado (5), ingenuamente se infectan con amastigotes (6), que se transforman de nuevo en promastigotes en el intestino del mosquito (dependiendo de especies de *Leishmania*, regiones diferentes del intestino son parasitadas 7;). Los parásitos migran a la probóscide del mosquito (8), completando así el ciclo biológico del parásito.

Disponible en <http://infection.thelancet.com> 2007.

El tiempo que toma el vector para ser infectante es de aproximadamente 10 días. En la naturaleza, la infección de los vectores es baja, por lo tanto se requiere que piquen repetidas veces.

c. Epidemiología

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades de alta prevalencia en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, tales como el este y sureste de Asia, Oriente Medio, norte y este de África, el sur de Europa (cuenca del Mediterráneo), América Central y Sudamérica. Es endémica en 88 países en áreas tropicales, 72 de los cuales están en vías de desarrollo. Ha sido descrita en 24 países de América, extendiéndose desde el sur de Estados Unidos (Texas) hasta el norte de Argentina. Se estima que la leishmaniasis afecta a 12 millones de personas en el mundo, de los cuales 1,5 a 2 millones de casos nuevos en todo el mundo pertenecen a Leishmaniasis cutánea y 500.000 casos de la forma visceral^(10,16). Existen 350 millones de personas que viven en zonas endémicas y están expuestas al riesgo de infección⁽¹¹⁾. La distribución geográfica de la leishmaniasis está limitada por la distribución del vector. El número de casos de leishmaniasis está aumentando debido principalmente a los cambios del medio ambiente generados por el hombre, lo que aumenta la exposición humana al vector.

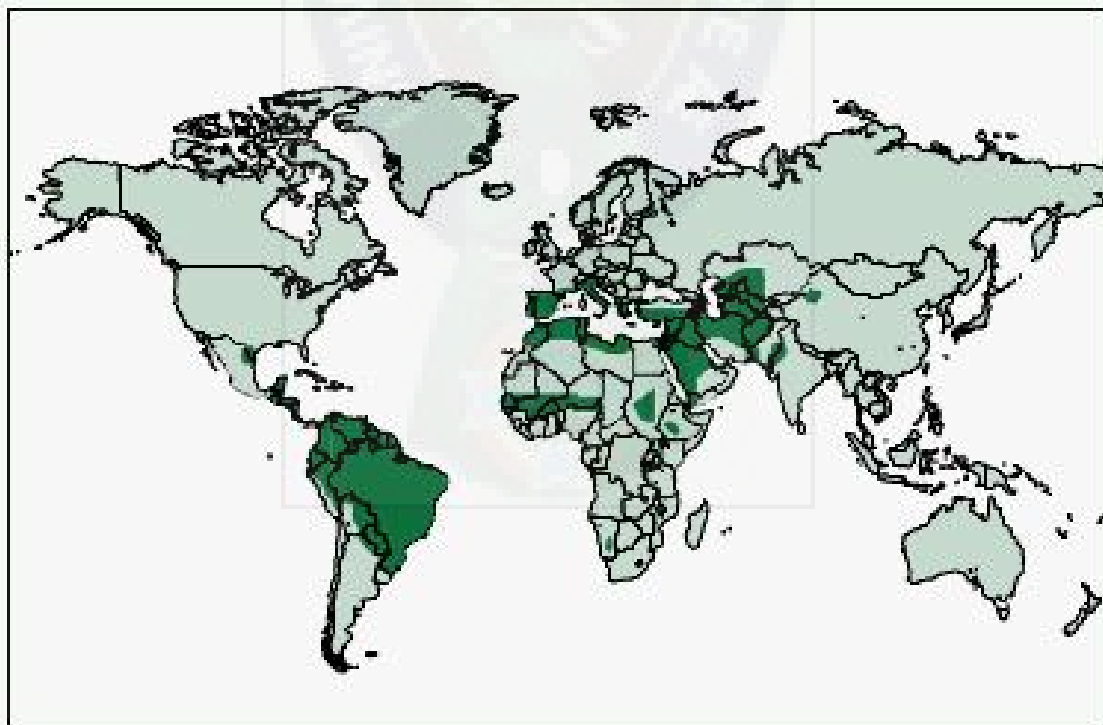


Figura Nº4 Distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea.

Adaptado de <http://infection.thelancet.com> 2007.

En Bolivia la Leishmaniasis se encuentra geográficamente distribuida en el área rural de las zonas tropicales y subtropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba y Tarija⁽¹²⁾. En el año 2006 se reportaron 3.152 casos sospechosos de leishmaniasis, siendo el departamento de La Paz el que notifica aproximadamente la mitad de los casos reportados con 1.502 casos (48% del total de casos), seguido por el departamento de Beni con 889 casos (28%) y Pando con 416 casos (13%). En ese año los municipios que reportaron mayor número de casos fueron: Riberalta 368 casos, Caranavi 274 casos, Palos Blancos 243 casos, La Asunta 163 casos, Chulumani 113 casos y Cobija 130 casos⁽¹³⁾. El 71% de los casos corresponden a un grupo etéreo entre los 15 a los 59 años de edad y alrededor del 80 % de estos son del género masculino.

En los últimos 24 años (1983 . 2006) se registraron en el país 35.714 casos autóctonos de Leishmaniasis Tegumentaria Americana, menos de 10 casos de L. visceral y 4 casos de L. cutánea difusa comparando los casos reportados en 1983 (278 casos) con los del año 2003 (2452 casos) se observa un incremento de la Leishmaniasis comparando la tasa por 100.000 habitantes de 4,1 en el año 1985, que pasa a 16,6 en el año 1993 y alcanza 32,7 en el año 2006⁽¹³⁾. Se ha podido certificar que en Bolivia circulan 4 especies parasitarias: *Leishmania (V) braziliensis*; *Leishmania (L) amazonensis*; *Leishmania (L) chagasi* y *Leishmania (V) guyanensis*; siendo vectores de: Leishmaniasis mucocutánea (LMC); Leishmaniasis cutánea (LC) y Leishmaniasis cutáneo-difusa (LCD); Leishmaniasis Visceral (LV) y Leishmaniasis cutánea (LC), respectivamente, generando estas últimas especies casos clínicos esporádicos^(4,9,14).

d. Fisiopatología de la enfermedad

Cuando el insecto vector pica al mamífero, las formas metacíclicas son liberadas en el punto de inoculación y están transitoriamente expuestas a los componentes potencialmente letales del suero. En ese momento se enfrentan a moléculas del complemento, anticuerpos y células fagocíticas, que van a ser capaces de eliminar hasta el 80% de los parásitos inoculados en la picadura. Sin embargo, un

porcentaje de los promastigotes evade la lisis mediada por complemento, usando la activación de éste como mecanismo para alcanzar la célula hospedadora, éstos inactivan la forma C3b que pasa a C3bi, la cual opsoniza los parásitos para la fagocitosis a través de los receptores del complemento CR3 y CR1, dirigiendo al parásito a su célula hospedadora.

Como los promastigotes carecen de la maquinaria necesaria para la invasión activa de las células, están limitados a la acción de los fagocitos profesionales (principalmente macrófagos y células dendríticas), con algunas excepciones como fibroblastos y neutrófilos. La interacción entre éstos y los parásitos está mediada por varios receptores de membrana. Una vez reconocidos, los promastigotes son internalizados y se localizan en los fagolisosomas. Dentro de ellos se transforman en amastigotes, donde se mantienen y replican. Para sobrevivir a los mecanismos potencialmente destructivos de los que está equipado el macrófago (radicales del oxígeno, óxido nítrico, enzimas lisosomales), los amastigotes de *Leishmania* deben defenderse mediante factores que inhiban o reduzcan el impacto de los mismos. Si los parásitos no son controlados por el macrófago, los amastigotes se reproducen dentro de él, rompen la célula y se diseminan por el sistema mononuclear fagocítico, causando los síntomas y patología asociados a la enfermedad.

Tras la multiplicación intracelular de amastigotes localizados en los macrófagos y las células dendríticas en el sitio de inoculación, las reacciones celulares generadas y las diversas citoquinas producidas dan lugar al desarrollo de una lesión cutánea localizada (LCL) la lesión primaria es una pápula eritematosa que presenta una base firme, indurada e hiperémica, que aparece de dos a ocho semanas después de la picadura del insecto vector, crece lenta y progresivamente, evolucionando a una o varias úlceras, las cuales aparecen, fundamentalmente, en las partes expuestas del cuerpo⁽¹⁶⁾. Presentan bordes irregulares y son indoloras. Muchas de las úlceras involucionan sin tratamiento en un lapso de 8 meses, especialmente las ocasionadas por *Leishmania mexicana*. Por su parte, en las infecciones por *Leishmania braziliensis* se presentan lesiones cutáneas acompañadas de linfadenopatías. Las cicatrices, consecuencia de las úlceras, son moteadas, deprimidas y nacaradas.



A. Lesión activa de *leishmania braziliensis*



B. Lesión cicatrizada de *leishmania braziliensis*

Figura Nº5 Lesión cutánea producida por *leishmania braziliensis*

A partir de ahí, los parásitos pueden ser transportados a los ganglios linfáticos de drenaje y difundirse a distintas zonas de la piel, dando lugar a una leishmaniasis cutánea difusa (LCD), que evoluciona en brotes, en donde las lesiones son de aspecto nodular, semejantes a las observadas en la lepra lepromatosa aparecen en la piel de forma diseminada y tienen tendencia a generalizarse. Compromete toda la superficie cutánea, excepto el cuero cabelludo y la región inguinal; en la leishmaniasis mucocutánea (LMC), después de una lesión cutánea inicialmente curada, se afectan especialmente la laringe, el septum nasal, la mucosa oral, etc. el tiempo entre una y otra localización puede ser de años, las lesiones son destructivas y se inician con una infiltración del septum nasal. En esta forma de leishmaniasis se afecta la respiración, la deglución y la fonación, como consecuencia, los pacientes son propensos a sufrir infecciones respiratorias y destrucción tisular deformante⁽¹⁶⁾; En otros casos, los parásitos se extienden a todos los órganos del sistema mononuclear fagocítico, provocando una leishmaniasis visceral (LV).

De esta manera, la expresión clínica de las leishmaniasis depende de la localización del parásito en los tegumentos o en otros órganos profundos del sujeto, lo cual está directamente ligado al tropismo de la especie de *Leishmania*,

las características genéticas de los parásitos y el estado inmunitario de los sujetos infectados.

e. Aspectos inmunológicos

En la leishmaniasis se destaca la importancia y complejidad de la respuesta inmunitaria del hospedador frente al parásito. Aparecen procesos inmunológicos diferentes, tanto humorales como celulares, y se observa también un amplio espectro de desórdenes y alteraciones inmunitarias.

La respuesta inmune a *Leishmania* comienza con la inoculación del parásito por el vector perteneciente al género *Lutzomyia*, la cual induce una respuesta inflamatoria ocasionando la migración de leucocitos polimorfo nucleares (LPMN), macrófagos y linfocitos hacia el sitio de la picadura^(15,19). Los parásitos poseen diversas moléculas en su superficie que actúan como factores de virulencia y como moléculas de evasión del sistema inmune del hospedero. Estos mecanismos incluyen un denso glucocálix compuesto por lipofosfolucanos (LPG), glucosilinositolfosfolípidos y además, el parásito secreta glucoconjugados, proteofosfolucanos, fosfatasas ácidas y la gp63, una metaloproteasa abundante en la superficie de los promastigotes que inhibe la lisis mediada por complemento y promueve la captación del parásito mediante la transformación de C3b en C3bi⁽³⁾. La gp63 y los lipofosfolucanos son las moléculas más abundantes en la superficie del parásito y funcionan como ligandos para receptores del macrófago, facilitando la entrada del parásito en la célula.

En los macrófagos, al igual que en otras células del sistema inmune innato, se han descrito receptores que reconocen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), entre estos receptores se encuentran los receptores TLR (*toll like receptors*). Se han informado de 11 TLR en mamíferos y 10 en humanos de los cuales TLR-9 se une a motivos CpG no metilados (en DNA de *Leishmania mexicana*) induciendo la sobreexpresión del RNAm de TLR-9 en macrófagos, así como la producción de TNF- α e IL-12_{p40}. En el sitio de la infección los macrófagos tisulares activados secretan abundantes citoquinas mediadoras de inflamación,

incluyendo el TNF- α , citoquina producida principalmente por macrófagos activados⁽²⁴⁾, las interleuquinas (ILs) IL-1, IL-6 e IL-12, al igual que proteínas C3 del Complemento⁽²⁰⁾, siendo las interleuquinas IL-1, IL-12, TNF- α , Factor Transformante Beta (TGF- β), Factor Quimiotáctico y Activador de los Monocitos (MCAF), las primeras en sintetizarse después del contacto con el parásito⁽²⁰⁾.

En cuanto al eosinófilo, se vio que, en presencia de antígenos parasitarios poseen un tiempo de generación medular menor y emergen desde la médula en 18 horas. Además se ha comprobado que expresan un mayor número de receptores Fc para IgE, IgG y complemento (C3b, C4), lo cual sería una evidencia de que el parásito influye en la maduración celular⁽²⁶⁾. Se sabe también, que los eosinófilos muestran una tendencia a la destrucción y/o al daño de los parásitos directa e indirectamente, y puede disminuir los daños desencadenados por su presencia al modular las reacciones de hipersensibilidad⁽²⁶⁾.

En diversos procesos infecciosos, la presencia de neutrófilos se asocia con susceptibilidad o resistencia a la infección. Algunos estudios con modelos animales sugieren un papel benéfico de esta célula durante la etapa temprana de la infección⁽²³⁾ y relacionan su presencia con lesiones menos graves y una menor carga parasitaria. Sin embargo, otros estudios sugieren que el neutrófilo es un actor de la patogenia de la enfermedad y relacionan su presencia con lesiones de mayor tamaño, disminución del INF- γ (relacionada con la resistencia a la infección) y aumento de IL-4 (relacionada con la susceptibilidad a la infección); otros trabajos sugieren que el papel deletéreo o protector de esta célula varía según la susceptibilidad del huésped y se encontró que los neutrófilos de animales resistentes inducen un mejor control del parásito y producen moléculas protectoras como TNF- α y elastasa en contraste con animales susceptibles.

En células NK se ha descrito que el LPG de *Leishmania* también es un ligando de receptores TLR-2 e induce la producción de IFN- γ por estas células.

También se ha informado que las células dendríticas mieloides estimuladas con ADN genómico de *Leishmania infantum* secretan altos niveles de IFN- γ , la cual fue dependiente de TLR-9⁽⁶⁾. La unión de TLR con su ligando desencadena la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas coestimuladoras⁽¹⁸⁾, dependiendo

del tipo de antígeno reconocido, participando en el desarrollo y mantenimiento de la respuesta inmune adaptativa.

Luego del contacto con los antígenos del parásito, expresados en la membrana del macrófago infectado, y según sean el tipo de célula presentadora de antígeno (CPA), los niveles de citocinas endógenas y la naturaleza del antígeno reconocido, las células T CD4+ y CD8+ proliferan y secretan un patrón de citocinas definidas con funciones efectoras diferentes. Las citocinas de tipo Th1, como IFN- γ y TNF- α , participan en la regulación del granuloma y la activación de macrófagos para aumentar su capacidad microbicida, además de inducir una respuesta humoral con los isotipos opsonizantes IgG₁ e IgG₃ en seres humanos (IgG_{2a} en ratones), mientras que las citocinas de tipo Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13^(15,17), regulan la producción de IgE por los linfocitos B que participan en la activación de reacciones de hipersensibilidad inmediata y eliminación de parásitos.

f. Diagnóstico

El diagnóstico de la Leishmaniasis cutánea se realiza tomando en cuenta los estudios clínicos, epidemiológicos, parasitológicos e inmunológicos que presenta el paciente.

Los estudios parasitológicos son métodos de diagnóstico directo que se basan en la determinación de la presencia del parásito en forma de amastigote en la lesión y promastigote en los cultivos. Entre los que se tiene el frotis de lesión, el cultivo, y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los estudios Inmunológicos son métodos de diagnóstico indirecto y se basan en la detección de la respuesta inmune celular o humoral por anticuerpos específicos desarrollados como consecuencia de la infección entre los que se tiene a la Intradermoreacción de Montenegro (IDRM), la Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el Ensayo Inmunoenzimático (ELISA).

i. Frotis de lesión

El frotis de lesión o exámen parasitológico directo (EPD) consiste en el raspado de los bordes de la lesión cutánea (hoja de bisturi o mondadientes en nuestro medio con un extremo en forma de bisel), dicho material se extiende en un portaobjetos, se tiñe con Giemsa al 2% o May Grünwald 50%- Giemsa 10% y se lo observa al microscopio óptico, donde se puede encontrar al parásito en forma de amastigote. Es un método rápido y con una sensibilidad del 60 % al 88 %⁽⁴¹⁾ la cual se ve afectada por varios factores como la cantidad de parasitos en el frotis, calidad de la tinción, el personal de toma de muestra y el lugar de la lesión del cual se toma la muestra, y la experticia del microscopista.

ii. Cultivo de parásitos

El cultivo de los parásitos de *Leishmania* es una técnica complementaria para el diagnóstico directo, ya que permite el aislamiento del parásito y facilita su detección. No existe un medio universal que permita el crecimiento de las distintas especies de *Leishmania*, ya que éstas presentan diferentes requerimientos nutricionales. A pesar de ello, los medios universalmente aceptados o más frecuentemente utilizados son los medios difásicos de agar sangre (medio de Novy, Nicolle y McNeal o NNN) y los medios líquidos para cultivos de células de insectos o mamíferos (Schneider, RPMI, etc.), habitualmente enriquecidos con suero bovino fetal desactivado (10-30%). Un hecho esencial, cuando se utilizan medios enriquecidos con suero bovino fetal, es que debe efectuarse un ensayo previo del lote para comprobar si permite el crecimiento y multiplicación de los parásitos, ya que se ha comprobado que algunos lotes presentan una notable citotoxicidad. Sea cual sea el medio de cultivo a elegir, se le deben añadir antibióticos (como estreptomicina y penicilina) para reducir las posibles contaminaciones⁽²⁸⁾.

iii. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica de Biología Molecular, la cual tiene la finalidad de copiar un fragmento en particular de DNA y producir un gran número de copias del mismo, posterior a la amplificación, la identificación de varios géneros de microorganismos se hace más sencilla.

La sensibilidad de estas técnicas varía en gran manera, pero depende principalmente de los marcadores de amplificación que se vayan a utilizar (primers o cebadores), dentro de los cuales lo que se busca es trabajar con un marcador genético que posea la mayor especificidad y sensibilidad. Varios estudios analizan estas variables en busca de mejores resultados, Bensoussan y col⁽³⁷⁾, el año 2006, realizaron un estudio utilizando tres tipos de secuencias genéticas para el diagnóstico de leishmaniasis en pacientes con diagnóstico de leishmaniasis cutánea. La sensibilidad del PCR con marcadores del gen de la glucoproteína 63 (gp63) fue del 53,8%; el PCR con marcadores de genes del rRNA presentó un 91% de sensibilidad, y el PCR con marcadores kinetoplastidae presentando una sensibilidad del 98,7%.

iv. Intradermoreacción de Montenegro (IDRM)

La prueba de intradermoreacción de Montenegro (IDRM), la cual mide la reacción de hipersensibilidad (RHC) retardada a antígenos homólogos o heterólogos de promastigotes de *Leishmania*, es de reconocida utilidad en el estudio clínico y epidemiológico de la leishmaniasis tegumentaria americana que consiste en la aplicación intradérmica de 0,1 ml (concentración de 30 µg/ml) de antígenos de Montenegro o leishmanina obtenidos de promastigotes de *Leishmania* muertos⁽²⁹⁾. Si resulta positiva ó reactiva se produce un máculo-pápula eritematosa de 5 mm o más de diámetro entre las 48 a 72 hs (reacción retardada).

La reactividad o positividad de la IDRM significa que el paciente presenta una infección presente o pasada; indica solamente que el paciente ha tenido contacto previo con el parásito. Es una prueba que mide inmunidad celular desarrollada en

el individuo infectado y permanece aún después de haber cicatrizado la lesión con o sin tratamiento. Puede resultar no reactiva en pacientes con lesiones de evolución reciente (1 ó 2 meses) ó en pacientes con compromiso inmunológico.

v. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia indirecta con antígeno crudo de *Leishmania* (IFIL) es uno de los métodos serológicos más utilizados, cuya cuantificación de títulos de anticuerpos se correlaciona bien con el grado de extensión de la infección (en LCD), aunque cabe aclarar que los títulos de anticuerpos no suelen ser altos. No existe hasta el momento un consenso sobre la utilidad de este método como diagnóstico de la L. cutánea. Oddone R. y colaboradores⁽²²⁾ realizaron estudios de sensibilidad de esta técnica, en otros países revelan resultados que van desde el 66,6% hasta el 82% y una sensibilidad del 60%.

Se debe tomar en cuenta que puede existir reactividad cruzada a títulos bajos en casos de enfermedad de Chagas, lupus eritematoso sistémico, malaria, toxoplasmosis, amebiasis, paracoccidiomicosis e incluso con tuberculosis pulmonar⁽²²⁾.

vi. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Antes del empleo de las técnicas inmunológicas (ELISA) el diagnóstico de la Leishmaniasis estaba restringido al diagnóstico clínico y parasitológico. Actualmente se emplean proteínas totales como antígenos para el diagnóstico inmunológico encontrando anticuerpos circulantes para los diferentes tipos de enfermedad, y alcanzando una sensibilidad del 92% y una especificidad limitada del 65%⁽²¹⁾ debido a las reacciones cruzadas que presenta esta con *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium*.

Además de esto también se está empleando la tecnología del ADN recombinante elevando la sensibilidad y la especificidad hasta un 87% y 95% respectivamente es decir, actualmente es posible aislar un gen responsable de la expresión de una proteína e introducirla a organismos como *Escherichia coli* para que puedan ser

mantenidos y perpetuados, de tal manera que es posible utilizar estas bacterias como fábricas biológicas para la producción y purificación de estas proteínas foráneas (proteínas recombinantes). Usando esta estrategia se han obtenido proteínas recombinantes para el diagnóstico de leishmaniasis visceral tales como K-39² y la proteína recombinante gp63⁽²¹⁾, lo que nos permite disponer de kits de diagnóstico altamente sensibles y específicos para el diagnóstico de Leishmaniasis logrando un impacto mayor en aquellas zonas en las que se presentan reacciones cruzadas con parásitos que comparten epitopes homólogos como *T. cruzi*

g. Tratamiento

El tratamiento de las leishmaniasis varía de acuerdo al tipo, la severidad de la enfermedad, el lugar donde se infecta el individuo y el estado nutricional e inmunológico del paciente, debido a que la respuesta ante la terapia no es la misma y varía entre unos y otros existen varios esquemas terapéuticos que incluyen a fármacos de primera y segunda línea siendo los más empleados los antimoniales pentavalentes, diamidinas aromáticas y la anfotericina B.

i. Antimoniales pentavalentes

El antimonio de Meglumina (Glucantime®) ha sido la principal herramienta en el tratamiento de las diferentes formas clínicas de la Leishmaniasis.⁽⁵⁾ Para poder ejercer su acción se convierten en trivalentes, reduciendo la formación de energía (ATP) del parásito y son más eficaces mientras más precoz sea el tratamiento. A nivel cutáneo se tienen altos índices de respuesta adecuada, aunque existe un porcentaje menor al 5% de ineficacia probada que se manifiestan como recidivas o reactivaciones. Su administración se realiza con 20mg/Kg de peso/día durante un periodo de 20 días recomendado en dos aplicaciones diarias. El antimonio de Meglumina se distribuye en ampollas de 5 ml, con 1,5 gramos de sal conteniendo 85 mg/ml de Sb⁵⁺ por lo que la dosis para casos con 40 Kg o más de peso es de 2 ampollas /día; y en casos con menos peso la proporción correspondiente. Aunque

el tratamiento produce cicatrización de la lesión, se observan efectos colaterales de importancia incluyendo manifestaciones clínicas y modificaciones de algunos parámetros de laboratorio como ser dolor en la región de la inyección, fenómenos alérgicos, febrículas, náuseas, anorexia, anomalías del electrocardiograma, anemia y agranulocitosis⁽⁴⁾.

ii. Anfotericina B

El agente antifúngico Anfotericina B ha sido ampliamente reconocido como fármaco leishmanicida. Es un macrólido poliénico producido por el actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Actúa principalmente uniéndose al ergosterol en las membranas celulares, alterando así la permeabilidad del potasio intracelular⁽³⁾. Los lípidos representan hasta el 15% del peso de *Leishmania* y, de ellos, los lípidos neutros como los esteroides y ésteres de esteroles, son muy abundantes. La Anfotericina B tiene fuerte actividad leishmanicida al unirse a ellos, provocando pérdida de potasio, aminoácidos y purinas. Además, potencia la cascada de iones del oxígeno del macrófago, con lo que aumenta el efecto leishmanicida. Tiene menos afinidad por el colesterol, el principal esteroles en las células de mamíferos, pero induce nefrotoxicidad a través de vasoconstricción renal, y posiblemente también por acción directa en las células epiteliales renales. A pesar de la nefrotoxicidad, la anfotericina B está siendo cada vez más usada como fármaco de elección en los casos de resistencia a los antimoniales pentavalentes y otras situaciones en las que los antimoniales están contraindicados.

Se recomienda administrar el producto de forma gradual con una dosis de 0,1mg/Kg de peso que se incrementa hasta llegar a 1 mg/Kg de peso en días alternos con la que se pretende alcanzar una concentración hemática de 0,5 a 2mg/L. la dosis máxima en un adulto no debe sobrepasar los 3 gramos, para menores de 15 años debe ser menor a 1,5 gramos⁽⁴⁾.

III. ANTECEDENTES

La defensa del organismo infectado con *Leishmania* involucra la inmunidad tanto de tipo celular como de tipo humoral. En la respuesta celular intervienen principalmente los macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y linfocitos T. La respuesta humoral esta mediada principalmente por anticuerpos específicos contra *Leishmania* como la IgG, IgE secretadas vía citoquinas como la IL-4, IL-10, producidas por la interacción de Linfocitos B con Linfocitos T. Estas inmunoglobulinas tienen diferentes funciones dentro la defensa inmunitaria como son la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC), activación del complemento por la vía clásica y alterna, la regulación de linfocitos B y la opsonización de promastigotes para su unión y posterior fagocitosis principalmente por los macrófagos.

En estudios recientes, se ha observado que la producción de inmunoglobulinas varía en función a varios factores como son la forma clínica de la enfermedad, la cantidad de parásitos y la cronicidad de la infección⁽³⁰⁾. Así, la producción de anticuerpos IgE específica contra *Leishmania* en respuesta al antígeno es consecuencia de la presencia de IL-4 secretada por las células Th2⁽³³⁾. La depresión del tipo celular Th1 en la respuesta inmune es característica de la leishmaniasis visceral, dado que la IL-4 participa en la síntesis de IgE, AM Atta y colaboradores, encontraron que los niveles de IgE específicos antes del tratamiento era mayor que después del tratamiento, estos resultados indican que una respuesta de IgE específica es útil en el diagnóstico de la enfermedad activa y para evaluar la respuesta al tratamiento⁽³²⁾. En otros estudios se observó que durante la fase aguda de la enfermedad se tuvo fuerte estimulación de la IgG, seguido por IgE e IgM y por último por anticuerpos IgA⁽³¹⁾.

Otros datos indican que durante la infección, el aumento de los niveles séricos de IgE y TNF- α se correlacionó con niveles elevados en la expresión de CD23 *in situ* (receptor de la IgE), IL4 y RNAm de TNF- α . Esta expresión desapareció después de un tratamiento exitoso, pero persistió en los pacientes resistentes a la terapia

leishmanicida. El análisis de la función del receptor CD23 en los monocitos humanos purificados indicó que este antígeno IgE media la producción de TNF- α anti-IgE-dependiente. Estos datos sugieren un posible papel *in vivo* de CD23 en la respuesta inmune aguda en humanos contra la Leishmaniasis cutánea (CL)⁽³⁵⁾. También, se observó que la producción de TNF- temprana dirigido a la activación de los macrófagos resulta en un control el crecimiento del parásito⁽³⁴⁾.

Recientemente, se demostró que el entrecruzamiento de IgE-CD23 promueve la destrucción intracelular de los parásitos de *Leishmania* en los macrófagos humanos, un fenómeno que implica la producción de factor de necrosis tumoral alfa y el óxido nítrico (NO). Sobre la base de diversos estudios humanos *in vitro* e *in vivo* de la Leishmaniasis cutánea, Djavad Mossalayi y colaboradores, proponen un modelo de respuesta inmune que involucra CD23-IgE-mediada para la liberación de NO en la protección, así como durante la Leishmaniasis cutánea activa⁽³⁶⁾.

IV. JUSTIFICACIÓN

Las Leishmaniasis son un grupo de enfermedades de alta prevalencia en muchas regiones tropicales y subtropicales de países en vías de desarrollo a nivel mundial. En nuestro país, se encuentra geográficamente distribuida en el área rural de las zonas tropicales y subtropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba y Tarija. Si bien se han reportado casos en Oruro y Potosí, estos han sido importados de zonas endémicas. La alta incidencia de la Leishmaniasis, se debe a las aproximadamente 800.000 personas con alto riesgo de contraer la enfermedad⁽¹⁾, que viven en regiones endémicas. Gracias a convenios interinstitucionales y programas nacionales de control de la Leishmaniasis, se continúa administrando el tratamiento principal contra la leishmaniasis que consiste en inyecciones diarias intramusculares de antimoniales pentavalentes como el Glucantime® el cual ha demostrado ser eficaz como agente Leishmanicida. Así también, se han realizado estudios *ex vivo* para el tratamiento de la enfermedad con alternativas de origen natural como líquenes y alcaloides quinolínicos propios de nuestro territorio. Sin embargo, no hay estudios *in vivo* que

comparen su eficacia terapéutica, toxicidad y los posibles efectos inmunomoduladores en el hospedador.

Si bien los pacientes tratados sea con medicamentos de primera línea, segunda línea, o a base de productos naturales muestran una cura clínica de la enfermedad, con una cicatrización de la lesión. Para controlar la eficacia de tratamiento se acostumbra determinar la presencia o ausencia del parásito en un Frotis teñido con Giemsa tomado del lugar de la lesión, una prueba de Inmunofluorescencia indirecta, o en otros casos se realiza una prueba molecular para detectar la presencia del DNA del parásito. Lamentablemente ninguno de estos métodos tiene la capacidad de decir si el paciente efectivamente hizo o no cura parasitológica de la enfermedad. Se conoce que pacientes que hicieron cura clínica, con Frotis negativo para *Leishmania* hicieron recidiva en el sitio de la infección (herida cicatrizada) por traumatismo posterior al tratamiento.

Existen antecedentes de investigaciones en los cuales se indica que una herramienta útil para determinar la cura parasitológica del paciente es la determinación de los niveles de anticuerpos. Entre estos los de tipo IgG e IgE, que están directamente relacionadas con la defensa del organismo contra el parásito y su producción es específica contra antígenos de *Leishmania* y que en modelo animal han demostrado tener una relación directa con la curación.

Es por esto que el presente trabajo de investigación se propone estandarizar dos pruebas de ELISA tipo indirecto, para determinar los niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgE anti- *Leishmania*, e identificarlos como marcadores de diagnóstico y como valor pronóstico favorable o no en la resolución de la enfermedad.

De esta manera se pretende brindar una herramienta más de apoyo al clínico que le permita tomar decisiones oportunas referidas al tratamiento y control de pacientes con leishmaniasis.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace unas décadas las Leishmaniasis se han convertido en un grupo de enfermedades emergentes a nivel mundial. Con el advenimiento del SIDA la

Leishmaniasis ha tomado mayor interés en los ámbitos de salud ya que en los países donde es endémica esta enfermedad se han incrementado los decesos por Leishmaniasis visceral. Otro aspecto que preocupa a la comunidad científica es la capacidad del parásito de modular la respuesta inmune del huésped a su favor. Recientemente, ha tomado el interés de la comunidad científica el incremento de las cepas resistentes a la primera línea de medicamentos quimioterapéuticos, lo cual ha motivado a buscar nuevas sustancias químicas de origen sintético o natural que eliminen al parásito.

Otro aspecto importante de la enfermedad, especialmente en la Leishmaniasis cutánea es que las heridas tienden a curarse solas en el transcurso de los 6 a 12 meses después del inicio de la infección, presentándose en el transcurso de la vida del paciente muchos períodos de infección, o como en el caso de la Leishmaniasis causada por *Leishmania braziliensis* la enfermedad puede evolucionar a la forma muco-cutánea, la cual en casos severos puede comprometer la vida del paciente o causarle desfiguraciones que le causan consecuencias negativas en el entorno social en el que este se desenvuelve.

El diagnóstico y tratamiento oportuno de la enfermedad consigue que en la mayoría de los casos el paciente haga la cura clínica de la enfermedad, la cual se evidencia por el cierre de la herida. Se sabe que en ocasiones, en pacientes que hicieron curación clínica de la enfermedad, por traumatismos en el lugar de la herida cicatrizada la enfermedad se llegó a reactivar. También sucede lo mismo en casos en que el paciente atraviesa un estado de inmunosupresión ya sea por medicamentos o por infección microbiana, lo cual significa que si bien el paciente como respuesta al tratamiento produce resorción de la herida no hace la cura parasitológica. Por lo tanto, los parásitos de *Leishmania* no son eliminados y permanecen en estado de latencia en el organismo del hospedador.

Por ello planteamos estandarizar dos pruebas de ELISA indirecto para determinar los niveles de anticuerpos IgG e IgE anti-*Leishmania* como marcadores de diagnóstico de la enfermedad.

VI. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Estandarizar pruebas de ELISA tipo indirecto para determinar los niveles de anticuerpos IgG e IgE-anti-*Leishmania*, como método complementario para el diagnóstico de la enfermedad.

b. Objetivos específicos

1. Estandarizar las condiciones para el cultivo continuo de los parásitos de *Leishmania braziliensis*.
2. Determinar las concentraciones de antígeno con las que se deben tapizar las microplacas de ELISA para determinar anticuerpos de tipo IgG e IgE.
3. Determinar las concentraciones óptimas del conjugado anti- gammaglobulina humana para la determinación de anticuerpos de tipo IgG e IgE por ELISA indirecto.
4. Determinar las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados.
5. Determinar el grado de correlación de los resultados de la prueba de ELISA IgG estandarizada con los resultados emitidos por un ELISA comercial.

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

a. Tipo de estudio

El trabajo de investigación corresponde a un estudio descriptivo

b. Población en estudio

La población en estudio corresponde a 80 muestras de suero de pacientes en los que se ha confirmado o descartado la presencia de leishmaniasis por clínica y laboratorio (Frotis y PCR).

VIII. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

a. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue definido por conveniencia y estaba conformado por 80 muestras de sangre periférica divididas en dos grupos (grupos A y B) el grupo A conformado por 65 muestras (50 negativas y 15 positivas) que fueron utilizadas para el proceso de estandarización propiamente dicho y determinación de la línea de corte de las pruebas de ELISA; el grupo B fue conformado por 25 muestras (10 negativas elegidas al azar de entre las 50 muestras negativas utilizadas en la estandarización y 15 positivas diferentes a las utilizadas en la estandarización), estas muestras fueron utilizadas para la determinación de la correlación de resultados del ELISA estandarizado frente a otro comercial (estandarizado, validado y comercializado en nuestro medio). Todas las muestras positivas (30) de los pacientes que participaron en el estudio fueron de pacientes atendidos en el servicio de Parasitología y Entomología del Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) de la ciudad de La Paz y todas las muestras negativas (50) fueron de pacientes atendidos en el Instituto de servicios de laboratorios de diagnóstico e investigación en salud (SELADIS).

b. Sueros control positivo

Se incluyeron las muestras de pacientes comprendidos entre los 18 y 55 años de edad que cursaban leishmaniasis cutánea, que habían sido confirmados por clínica y laboratorio y que no recibieron tratamiento previo leishmanicida, donados bajo codificación por el INLASA.

Durante la estandarización de la técnica se emplearon 15 muestras positivas, para la determinación de la correlación de resultados se emplearon 15 muestras positivas diferentes a las utilizadas en la estandarización.

c. Sueros control negativo

Se incluyeron las muestras de los pacientes comprendidos entre los 18 y 55 años de edad que no cursaban por ningún tipo de leishmaniasis, confirmados por IFI, sin lesión y que no habían estado en zonas endémicas.

Durante la estandarización y determinación de la línea de corte de la técnica se emplearon 50 muestras negativas, para la determinación de la correlación de resultados se emplearon 10 muestras negativas elegidas al azar de entre las 50 muestras negativas utilizadas en la estandarización.

d. Aspectos éticos

Las muestras positivas de los grupos A y B utilizadas en el presente estudio fueron donadas por el INLASA, las cuales habían sido catalogadas como positivas mediante análisis clínicos y de laboratorio. Para proteger la identidad de los pacientes el INLASA entregó las muestras bajo codificación, por lo cual no se conoce en nombre ni la edad exacta del paciente, la procedencia, la fecha de la toma de la muestra, ni el tiempo en que esta había estado guardada.

IX. CONTEXTO Y LUGAR

El presente trabajo fue desarrollado en los ambientes del Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS dependiente de la

X. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Materiales

i. Material de vidrio y plástico

- Cajas de cultivo celular
- Pipetas Pasteur
- Cámara de Newbauer
- Porta objetos
- Tubos cónicos de poliestireno de 15ml (Falcon).
- Pipetas
- Micropipetas (Eppendorf) y puntas

ii. Equipos

- Microscopio óptico OLYMPUS (BH-2), Japan.
- Microscopio invertido OLYMPUS (CK-2), Japan.
- Centrífuga Hettich Zentrifugen (Germany)
- Microcentrífuga Hettich Zentrifugen MIKRO 22 (Germany)
- Refrigerador (4 y -20 °C) White Weatinghouse, USA
- Campana de flujo Gelaire BSB-4A, Flow Laboratories, USA
- Estufa a 37°C, 5% CO₂ y 99% HR, NUAIRE NU-8500E
- Estufa a 26°C BINDER (BD-53).
- Lector de ELISA Bio-teck Instruments Inc, USA
- Mezclador térmico para microtubos Fisher Scientific, USA

iii. Reactivos

- Medio de cultivo de parásitos Schneider's Insects Medium, SIGMA.
- Albumina sérica bobina (BSA)
- Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7.4 NaCl 0,15 M. (ANEXO 1)
- Tampón carbonato . bicarbonato 0,1 M pH 9,6. (ANEXO 2)
- PBS . Tween 20 al 0,05 % (ANEXO 3)
- PBS . Tween 20 al 0,05 % BSA 0,1% (ANEXO 4)
- PBS . BSA 0,1% (ANEXO5)
- Tampón citrato . fosfato 0,05 M pH 5 (ANEXO 6)
- Sustrato Orto fenil diamina OPD . SIGMA (ANEXO 7)
- Polietilenglicol (PEG) al 12,5% (SIGMA) (ANEXO 8)
- Anticuerpo monoclonal anti-IgG humano marcado con peroxidasa (SIGMA)
- Anticuerpo monoclonal anti-IgE humano marcado con peroxidasa (SIGMA)
- Anticuerpo monoclonal anti-IgG humano (SIGMA)
- Azul de tripán
- Tinción GIEMSA
- Penicilina 50 U/mL ; Estreptomina 50 g/ml
- Acido sulfúrico 3N
- Peróxido de Hidrogeno 10 vol.
- Aceite de inmersión

b. Métodos

i. Cultivo de Parásitos

Los Promastigotes de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) donadas al laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética hace varios años, fueron descongelados como sigue: se tomó 1 tubo de crio preservación que estaba congelado en nitrógeno líquido (a -80°C), se depositó en tubo en un baño de agua a 37 °C. Después se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos y se desechó el

sobrenadante. Luego, se resuspendió el precipitado con 1 ml de medio de cultivo Schneider's suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (penicilina y estreptomina al 0,5%) en un tubo Falcon de 15 ml hasta un volumen de 5 ml, se volvió a centrifugar, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 5ml de medio de cultivo el cual fue trasvasado a una caja de cultivo de 25 cm², luego los promastigotes fueron cultivados en estufa a 26 °C. Los parásitos fueron cultivados haciendo ~~pasos~~ cambios de medio cada 72 horas y para las pruebas *in vitro* fueron cosechados durante la fase estacionaria de crecimiento. El manejo de los promastigotes desde su descongelación se realizó con guantes de látex, todos los procedimientos con excepción de la centrifugación se realizaron bajo la protección de la campana de flujo.

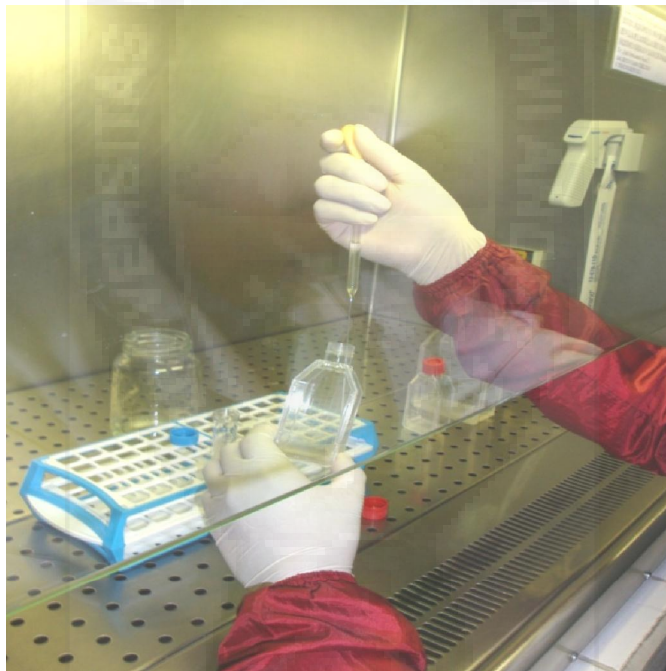


Figura N°6 Cultivo de parásitos.

Obtención de promastigotes de L. braziliensis en fase estacionaria de crecimiento.

ii. Obtención del antígeno soluble de *Leishmania* (ASL)

Los promastigotes de *L. braziliensis* fueron cultivados como antes se describió. Se cosecharon los parásitos durante la fase estacionaria de crecimiento. Para obtener los antígenos del parásito, se recuperó el contenido de una caja de cultivo en un tubo Falcon de 15 ml utilizando pipetas Pasteur con filtro y se procedió a realizar 3

lavados enrazando con PBS celular hasta un volumen de 12 ml, luego se centrifugó a 2500 rpm por 5 min, después, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con PBS celular, se repitió este procedimiento de lavado 3 veces. Luego del tercer lavado, se resuspendió el precipitado en un volumen de 6 ml de PBS celular, se realizó el recuento de parásitos en una cámara de Newbauer y se realizó un ajuste celular hasta obtener una concentración de entre 3 y 20,0 x10⁶ parásitos, luego fueron sometidos a sonicación directa a 100 watos de potencia y 3 pulsaciones por segundo, cumpliendo 10 ciclos alternos de 1 minuto de sonicación y 30 segundos de reposo para provocar la total ruptura de las células, esto se verificó observado una alícuota de 20 µl de muestra sonicada con 20 µl de azul de tripán al microscopio con la finalidad de descartar la presencia de promastigotes.

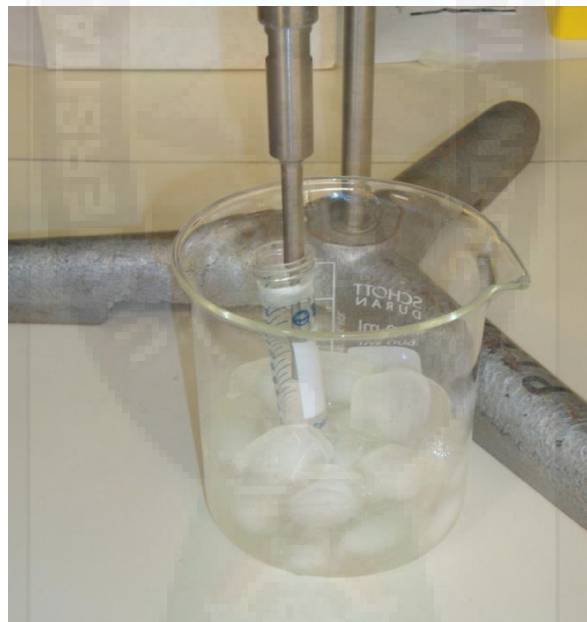


Figura N°7 Sonicación directa de los promastigotes de *Leishmania braziliensis*

Luego, se siguieron dos protocolos, en el primero se trabajó con la muestra total sonicada a partir de la cual se evaluó su concentración de proteínas⁽³⁰⁾, en el segundo protocolo se centrifugó la muestra a 6800 rpm por 15 minutos y se trabajó solo con el sobrenadante⁽³¹⁾. En ambos casos la concentración de ASL fue evaluada por el método de Lowry (ver Anexo N°9) 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. Para determinar cuál de estos dos protocolos era el ideal para realizar la obtención de ASL, se procedió a preparar las placas como se explica en el punto 3 y se hicieron análisis por triplicado de un suero control positivo y un suero control negativo utilizando los reactivos y condiciones de trabajo propuestos en el kit comercial r-biopharm® (ver punto 7) que además fue utilizado para la correlación de resultados explicado más adelante.

iii. Preparación de las placas de microtitulación de ELISA con ASL

Para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-*leishmania* mediante la técnica de ELISA indirecto se evaluaron dos protocolos de tapizado y pos-tapizado (tabla N° 1), los cuales se desarrollaron de la siguiente manera:

a. Fijación de antígeno (ASL): se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano Greiner bio-one (CELLSTAR®) preparando soluciones de ASL con diferentes concentraciones (tabla N° 1), como diluyente del antígeno se evaluaron dos tampones (tabla N° 1). De las soluciones diluidas se sembraron 100 μ l por pozo y se dejaron 30 minutos en agitación suave a 250 rpm y a 37°C. Luego se dejaron en incubación con sus respectivas tapas a 4°C durante toda la noche, para que los antígenos se fijen adecuadamente a los pocillos.



Figura N°8 Sembrado del ASL para la fijación del antígeno por 18 horas a 4°C.

Después de este periodo 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%.

b. Postapizado: se añadieron 200 μ l de una solución de bloqueo en evaluación (tabla N° 1) y se dejó en incubación a 37°C de 1 a 2 horas, buscando que durante este periodo de incubación se tapicen perfectamente las zonas que no hayan sido recubiertas por el antígeno, evitando de esta manera absorciones inespecíficas de las inmunoglobulinas. Después, se procedió a lavar los pozos como ya se mencionó para eliminar los excedentes de la solución bloqueante y se procedió a guardar las placas con perlas de silicagel para protegerlos de la humedad y dentro de bolsas de cierre hermético a -4 °C hasta su utilización.

Tabla N° 1. Condiciones de trabajo para el tapizado y el postapizado de las microplacas.

	CONCENTRACION DE ASL (mg/ml)	TAMPONES DE TAPIZADO	SOLUCION DE BLOQUEO
PROTOCOLO 1	20,10,5,1	Tampón Carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.6	PBS . BSA al 0,1 %
PROTOCOLO 2	20,10,5,1	Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7.4 NaCl 0,15 M	PBS . Leche Morinaga al 5 %

Se expresan las diferentes concentraciones de antígeno soluble de *Leishmania* (ASL), los tampones evaluados, utilizados como diluyente de ASL para el tapizado y las soluciones de bloqueo evaluadas para el tapizado de las placas.

iv. Estandarización de la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos IgG anti-*Leishmania*.

Todos los procesos para la estandarización de la técnica de ELISA se hicieron por triplicado y se realizaron de la siguiente manera:

a. Adición de sueros: en base a los trabajos previos K. Anam et al y AM. Atta y colaboradores, se realizaron diferentes diluciones de los sueros de referencia (tabla N° 2) control positivo (+) y negativo (-) en PBS. Tween 20. BSA al 0,1 %. De estas diluciones se añadieron 100 μ l por pocillo (TABLA N° 2); Luego se dejó en

incubación a diferentes tiempos 30 minutos, 1 hora y 2 horas (tabla N°2) posteriormente se lavaron las placas 3 veces con 300 μ l de PBS . Tween 20 al 0,05%, primero eliminando el suero y luego la solución de lavado por inversión sobre un recipiente y luego sobre papel absorbente para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado con el ASL.



Figura N°9 Adición de los sueros a las diluciones establecidas para su evaluación

b. Adición de anti-anticuerpos conjugados con peroxidasa: se evaluaron dos diluciones del conjugado, se prepararon diluciones de 1/100 y 1/500 del anticuerpo anti-IgG humano conjugado con peroxidasa en PBS. Tween 20 . BSA al 0,1 % y se añadieron 100 μ l de estas diluciones por pocillo, se dejó en incubación a 37°C en los tiempos que se muestran en la tabla 2. Después, se lavaron las placas tres veces con PBS. Tween 20 al 0,05 % para eliminar el conjugado que no había reaccionado.

- c. Adición del sustrato: se preparó una solución de orto-fenil-diamina (OPD) en tampón citrato-fosfato 0,05 M pH 5 de la cual se añadieron 100 µl por pocillo y se dejó en incubación a 37°C por 30 minutos.
- d. Parado de la reacción: se realizó añadiendo 50 µl H₂SO₄ 3N por pocillo.
- e. Lectura de las densidades ópticas: se realizaron lecturas a 490-630 nm de longitud de onda, en un lector de ELISA (Bio-teck Instruments Inc, USA)

Tabla N°2. Protocolos de trabajo evaluados para la estandarización de la técnica ELISA IgG anti-*Leishmania braziliensis*.

PROTOCOLO	DILUCIÓN DEL SUERO	DILUCIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL SUSTRATO
1	1/21 1/51 1/100 1/500	1/100 1/500	30 minutos a 37°C	30 minutos a 37°C	30 minutos a 37°C
2	1/21 1/51 1/100 1/500	1/100 1/500	1 hora a 37°C	30 minutos a 37°C	30 minutos a 37°C
3	1/21 1/51 1/100 1/500	1/100 1/500	1 hora a 37°C	1 hora a 37°C	30 minutos a 37°C
4	1/21 1/51 1/100 1/500	1/100 1/500	2 horas a 37 °C	1 hora a 37°C	30 minutos a 37°C

Se muestran las condiciones de trabajo que fueron evaluadas para la estandarización del ELISA IgG anti-*leishmania* las diferencias en las diluciones del suero, conjugado y tiempos de incubación tanto del suero, del conjugado y del sustrato que brindaron diferentes niveles de DO que nos permitieron elegir a el protocolo N° 2 como el ideal para realizar la estandarización de la técnica, ya que nos permitió discriminar mejor entre los valores de DO de los controles positivos (+) y negativos (-) de los sueros utilizados.

v. Estandarización de la técnica de ELISA indirecto para determinar anticuerpos IgE anti-*Leishmania*.

Una vez conocidos los resultados de la estandarización de la técnica de ELISA indirecto tipo IgG se realizó la estandarización del ELISA indirecto tipo IgE de la siguiente manera:

a. Precipitación de anticuerpos tipo IgG (PRE-TRATAMIENTO): previo al desarrollo de la técnica ELISA se realizó un tratamiento a los sueros controles positivos (+) y negativos (-) con el objetivo de eliminar la competencia por el sitio activo del determinante antigénico por las inmunoglobulinas de tipo IgG⁽³²⁾, se procedió de la siguiente manera:

Se preparó una solución stock de anticuerpos anti-IgG humano a una dilución de 1/500 (indicada por la casa comercial) se usó como diluyente solución salina fisiológica (SSF). En tubos Eppendorf de 1,5 ml se depositaron 200 μ l de los sueros control a los cuales se añadieron 25 μ l de la solución de anticuerpos anti-IgG humano, se mezcló bien en Vórtex y se dejó en incubación por 1 hora a 26 °C en agitación suave a 250 rpm.



Figura N°10 Fase de pre-tratamiento de los sueros para la eliminación de IgG interferente, incubación por 1 hora a 26 °C en agitación suave a 250 rpm (Microtube thermal mixer)

Después de este período, a los 200 μ l de muestra tratada se añadieron 160 μ l de SSF y 60 μ l de Polietilenglicol al 12,5 % (PEG) se mezcló bien y se dejó en incubación por 30 minutos a 37 °C, se centrifugaron los tubos a 3500 rpm por 15 minutos y se traspasó el sobrenadante un nuevo tubo Eppendorf. A partir de las muestras tratadas se realizó la técnica de ELISA. El precipitado obtenido en el paso anterior correspondía a complejos inmunes IgG-anti IgG precipitados por acción del PEG.

b. Determinación de la dilución óptima de los sueros: se realizaron diferentes diluciones de los sueros control positivo (+) y negativo (-) pre-tratados. Se tomó en cuenta las diluciones previas de las muestras durante el pre-tratamiento con anticuerpos anti-IgG y se hizo el ajuste a diluciones 1/10 y 1/21 de los sueros control positivo (+) y negativo (-) tanto de los sueros pre-tratados como de los sueros sin pre-tratamiento (para verificar si efectivamente disminuían los títulos de Ac tipo IgG en el suero por acción del pre-tratamiento) en PBS. Tween 20. BSA al 0,1 % de los cuales se añadieron 100 μ l por pocillo, se trabajó por triplicado en las placas de ELISA con concentraciones de 10 y 20 μ g/ml de ASL, y luego se dejó en incubación a 37°C por 1 hora (TABLA N° 3) posteriormente se lavaron las placas como ya se mencionó para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado.

Para determinar si el proceso de precipitación de anticuerpos tipo IgG había sido eficiente se evaluó por el ELISA-IgG anti-*Leishmania*, si existía una disminución de los anticuerpos tipo IgG en los sueros tratados y se comparó con los valores de absorbancia de los anticuerpos en suero sin tratar.

c. Determinación del título óptimo del conjugado: se evaluaron dos diluciones del conjugado, para ello se preparó una dilución 1/100 y 1/500 de los anticuerpos anti-IgG e IgE humano conjugado con peroxidasa en PBS. Tween 20. BSA al 0,1 % y se añadieron 100 μ l por pocillo, se dejaron en incubación a 37°C por 30 minutos. Después se lavaron las placas tres veces con PBS . Tween 20 al 0,05 % para eliminar el conjugado que no había reaccionado.

d. Adición del sustrato: se añadieron 100 μ l por pocillo de la solución de OPD disuelto en tampón citrato-fosfato 0,05 M pH 5 y se dejaron en incubación a 37°C por 30 minutos.

- e. Parado de la reacción: se realizó añadiendo 50 μ l de H₂SO₄ 3N por pocillo
- f. Lectura de las densidades ópticas: se realizaron lecturas a 490-630nm en un lector de ELISA (Bio-teck Instruments Inc, USA)

Tabla N°3. Protocolo de trabajo para la determinación de anticuerpos IgE Anti-*Leishmania*

CONCENTRACIÓN DE ASL (μ g/ml)	DILUCIÓN DEL SUERO PRE TRATADO	DILUCIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN CON EL SUSTRATO
10	1/10	1/100	1 hora a 37°C	30 minutos a 37°C	30 minutos a 37°C
20	1/21	1/500			

Se observan las diferentes concentraciones de antígeno soluble de *Leishmania* (ASL), las diluciones del suero, del conjugado y los tiempos de incubación de la muestra, conjugado y sustrato evaluados durante en la estandarización del ELISA tipo IgE, tomando como base los resultados obtenidos con el protocolo N° 2 en la estandarización del ELISA tipo IgG.

vi. Determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados

La determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados, una vez determinados los tiempos de incubación, las diluciones de los sueros, del conjugado y del sustrato se realizó de dos maneras: en la primera se procesaron 50 muestras negativas de cuyos valores de DO se encontró el promedio y la desviación estándar (DS), al valor promedio se le sumó el valor de 3 veces la desviación estándar y de esta manera se encontró el cut-off del test. En el segundo caso se procesaron 10 muestras negativas de las cuales se encontró la línea de corte igual que en anterior caso y se procesaron al mismo tiempo 15 muestras positivas para verificar cuan cerca o lejos se encontraban sus valores (positivos) de la línea de corte.

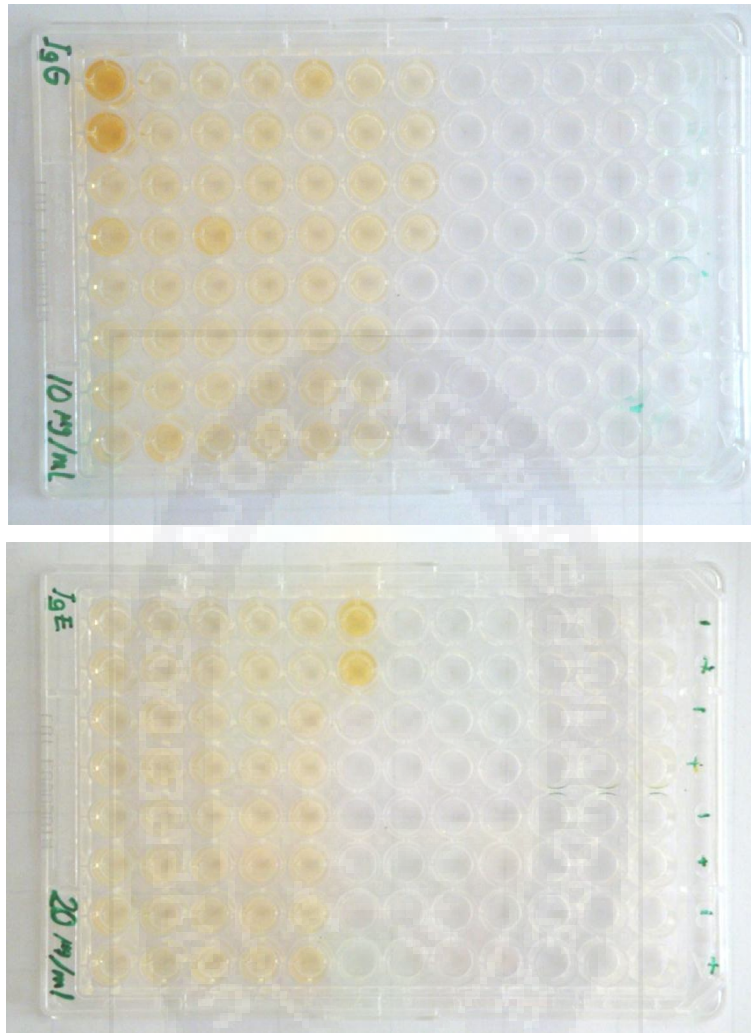


Figura N°11 Placas de ELISA con la reacción colorimétrica obtenida al procesar 50 muestras negativas para evaluar los dos tipos de anticuerpos IgG e IgE

vii. Determinación de la repetitividad del estudio

Para determinar el grado de repetitividad del estudio, se evaluaron dos sueros control uno positivo y otro negativo, tomados al azar de entre los sueros utilizados durante la estandarización del ELISA indirecto IgG anti-*Leishmania*, estos sueros fueron alicuotados al momento de recibirlos en un volumen de 15 µl y guardados a -20°C en tubos Eppendorf nuevos de 200 µl. Para ser analizados los sueros positivos y negativos fueron descongelados y se procesaron bajo las mismas condiciones de trabajo pero en diferentes tiempos con un intervalo de 48 horas entre cada uno de los cinco análisis

viii. Determinación de la correlación de resultados del ELISA IgG estandarizado frente a los resultados de un ELISA comercial que mide anticuerpos anti-IgG anti-*Leishmania*

a. Para determinar el grado de correlación de resultados entre el ELISA tipo IgG estandarizado y un ELISA indirecto comercial que mide anticuerpos IgG anti-*Leishmania*, se procesaron 15 muestras positivas (+) diferentes a las muestras positivas utilizadas para la estandarización y 10 muestras negativas (-) utilizadas como control de repetitividad elegidas al azar de entre las 50 muestras negativas utilizadas en la estandarización, aplicando las condiciones de trabajo estandarizadas y las condiciones de trabajo establecidas en el kit comercial.

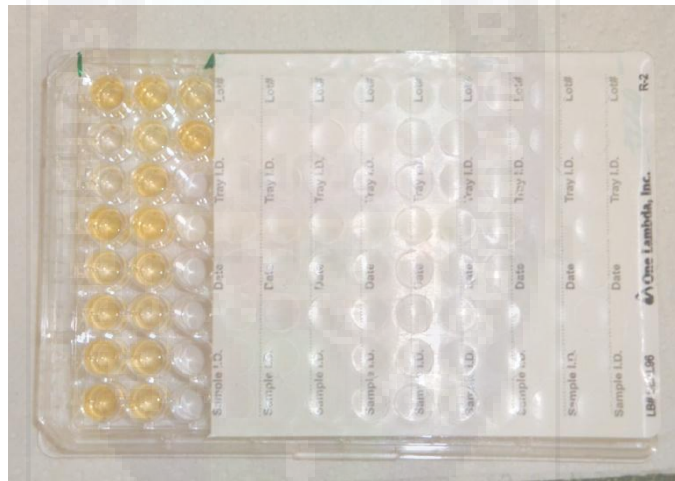


Figura N°12. Placa de micropozos con las 15 muestras positivas evaluadas con el ELISA IgG estandarizado, con 1 control positivo y dos controles negativos

b. El protocolo de trabajo de ELISA comercial Ridascreen. Biopharm® consiste en los siguientes pasos: 1º se realiza una dilución 1/500 de los sueros de pacientes con solución diluyente. 2º se deben sembrar en los micropozos de ELISA, 100 µl de control positivo (sin diluir), 100 µl de control negativo (sin diluir) por duplicado y 100 µl de las diluciones de los sueros. 3º incubar la placa de ELISA por 15 minutos a temperatura ambiente. 4º realizar 5 lavados con 300 µl de buffer de lavado, se debe eliminar la solución de lavado por inversión sobre papel absorbente. 5º sembrar 100 µl de conjugado e incubar 15 minutos a temperatura

ambiente. 6º realizar 5 lavados con 300 µl de buffer de lavado como en el anterior paso. 7º sembrar 50 µl de sustrato y 50 µl de cromógeno e incubar 15 minutos a temperatura ambiente. 8º parar la reacción con 50 µl de solución de parada. 9º realizar la lectura de absorbancia a 450 nm de longitud de onda.

Para la interpretación de resultados se debe calcular el cut-off, encontrando el valor promedio de los controles negativos (-). A este valor promedio se le suma 0,150. Como resultado se obtiene el cut-off del test. Dividiendo el valor de la absorbancia de la muestra por el valor del cut-off se obtiene el índice de las muestras.

Por ejemplo:

Control negativo 1 DO = 0,115

Control negativo 2 DO = 0,125

Muestra DO = 0,508

$$\text{cut-off} = \frac{0,115 + 0,125}{2} + 0,150$$

$$\text{cut-off} = 0,270$$

$$\text{índice de las muestras} = \frac{0,508}{0,27}$$

$$\text{índice de las muestras} = 1,88$$

Interpretación de resultados:

NEGATIVO	VALORES LIMITE	POSITIVO
< 0,9	0,9 - 1,1	> 1,1

El control de calidad debe ser: control positivo (+) índice > 0,8. Control negativo (-) índice < 0,3.

XI. RESULTADOS

Con la finalidad de cumplir con los objetivos planteados en el presente estudio, en primer lugar se realizó la obtención de antígeno soluble de *Leishmania*, antígeno requerido para poder tapizar las placas de microtitulación de 96 pozos con las cuales se realizarían las pruebas de ELISA indirecto para la evaluación de los niveles de anticuerpos de tipo IgG e IgE anti-*Leishmania*.

a. Obtención del antígeno soluble de *Leishmania* (ASL)

Durante la obtención del antígeno soluble de *Leishmania* (ASL) se evaluaron las concentraciones de ASL que se pueden obtener a partir de diferentes concentraciones de promastigotes en cultivo, en base a los estudios realizados por K. Anam y colaboradores⁽³¹⁾ y V. Iniesta⁽³⁰⁾, se siguieron dos protocolos expresados en la tabla N° 4a. Los resultados obtenidos de la cuantificación de proteínas por el método de Lowry, muestran una relación directamente proporcional entre el número de células/ml utilizado y la concentración de proteínas obtenidas a partir de cultivos de promastigotes en fase estacionaria de crecimiento.

En la gráfica 1 y tabla 4, se puede observar que no existe una diferencia notable entre los dos protocolos empleados en la obtención del ASL en cuanto a valores se refiere ya que existe proporcionalidad entre las concentraciones de ASL obtenidas y la concentración de células/ml con las que se trabajó, sin embargo en la práctica se pudo observar que con el ASL obtenido a partir del segundo protocolo se obtuvieron mejores resultados y se determinó que el rango de concentración de ASL óptimo para lograr un eficiente tapizado de las placas de ELISA era de 180 a 235 µg/ml.

En la tabla 5 se muestra que utilizando el método de obtención de ASL propuesto por V. Iniesta, no se tiene una buena diferenciación entre los sueros control positivos y sueros negativos teniendo valores de densidad óptica de los sueros control negativos muy elevados y por encima del valor propuesto en el kit comercial r-biopharm® (<0,300), esto no ocurre cuando se utiliza el protocolo propuesto por

K. Anam, donde si se observa una buena diferenciación entre resultados positivos y negativos y se tienen valores de densidad óptica de los sueros control negativos dentro del rango propuesto por el kit comercial.

Tabla Nº4. Concentración de proteínas obtenidas (ASL) por el método de sonicación a partir de diferentes concentraciones de cultivo de promastigotes

	Recuento de parásitos Cel/ml	Densidad óptica (D.O.) por el método de Lowry	Concentración de ASL $\mu\text{g/ml}$	PROMEDIO
Protocolo 1 [†]	$3,50 \times 10^6$	0,027	18	24,66
	$3,65 \times 10^6$	0,036	27	
	$5,80 \times 10^6$	0,038	29	
Protocolo 2 [‡]	$11,25 \times 10^6$	0,119	110	177,66
	$13,25 \times 10^6$	0,197	188	
	$16,50 \times 10^6$	0,241	235	

† Utilizando el protocolo propuesto por V. Iniesta

‡ Utilizando el protocolo propuesto por K. Anam y colaboradores

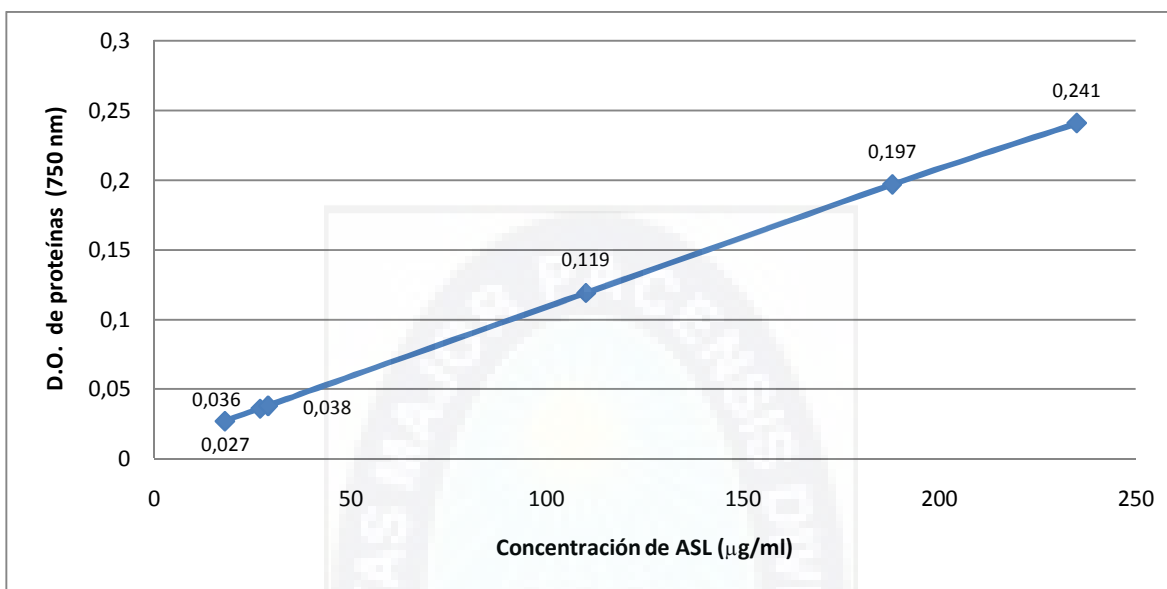
Tabla 5. Densidades ópticas obtenidas al analizar el sueros control positivo y negativo utilizando el ASL obtenido a partir de los dos protocolos evaluados

[ASL]	20 ug/ml		10 ug/ml		5 ug/ml		1 ug/ml	
SUEROS CONTROL	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
PROTOCOLO 1 [†] \bar{X} DO	2,188	0,646	1,686	0,446	0,783	0,417	0,717	0,446
PROTOCOLO 2 [‡] \bar{X} DO	0,820	0,247	0,685	0,194	0,535	0,178	0,475	0,184

† Utilizando el protocolo propuesto por V. Iniesta

‡ Utilizando el protocolo propuesto por K. Anam y colaboradores

Gráfica N°1. Relación entre las densidades ópticas (DO) y las concentraciones de proteínas obtenidas de ASL a partir de cultivos de promastigotes.



Se observa la relación entre la absorbancia y la concentración de proteínas de ASL obtenidas a partir de cultivos de parásitos de *Leishmania* en fase estacionaria de crecimiento.

b. Estandarización de las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos tipo IgG anti-*Leishmania*

Para estandarizar las condiciones de trabajo de la concentración de ASL, dilución de los sueros, y conjugado y tiempos de incubación a utilizar en la prueba de ELISA, se realizaron los experimentos que se muestran en la Tabla N°6.

En las tablas 6-A,B,C,D, se pueden observar los resultados obtenidos en valores de densidad óptica (DO) de los diferentes protocolos de trabajo evaluados (**6-A.** protocolo de trabajo N°1. **6-B.** protocolo de trabajo N°2. **6-C.** protocolo de trabajo N°3. **6-D.** protocolo de trabajo N°4.); todas las pruebas se realizaron por triplicado. En la tabla 6, se muestra el valor promedio de D.O obtenido en cada experimento. La concentración ideal de ASL que permitió discriminar con mayor facilidad la D.O entre los sueros positivos y negativos empleados fueron de 10 y 20 µg/ml, además estos valores se utilizaron como referencia para determinar la línea de corte de la técnica ELISA que se expresará más adelante.

Tabla Nº 6. Esquema general de los experimentos realizados y resultados del promedio de densidad óptica obtenidos para la determinación de la concentración de ASL, dilución de sueros y conjugados anti-IgG humano ideales para determinar resultados positivos y negativos en base a la presencia o ausencia de anticuerpos de tipo IgG anti-*Leishmania*.

Tabla Nº 6-A. Protocolo de trabajo Nº 1.

PROCOLO DE TRABAJO Nº 1											
DILUCIÓN DEL CONJUGADO 1/100											
Concentración de ASL	DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/21		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/51		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/100		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/500		TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUSTRATO
	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)			
20 µg/ml	1,103	0,328	0,868	0,299	0,657	0,283	0,407	0,301	30min ; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
10 µg/ml	0,940	0,297	0,758	0,327	0,573	0,268	0,349	0,271	30min ; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
5 µg/ml	0,853	0,313	0,698	0,287	0,535	0,285	0,317	0,233	30min ; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
DILUCIÓN DEL CONJUGADO 1/500											
Concentración de ASL	DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/21		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/51		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/100		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/500		TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUSTRATO
	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)			
20 µg/ml	0,594	0,183	0,461	0,171	0,335	0,167	0,191	0,150	30min ; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
10 µg/ml	0,564	0,198	0,477	0,202	0,342	0,186	0,203	0,153	30min ; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
5 µg/ml	0,600	0,199	0,481	0,208	0,350	0,195	0,175	0,165	30min ; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C

Tabla Nº 6-B. Protocolo de trabajo Nº 2.

PROTOCOLO DE TRABAJO Nº 2											
DILUCIÓN DEL CONJUGADO 1/100											
Concentración de ASL	DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/21		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/51		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/100		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/500		TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUSTRATO
	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)			
20 µg/ml	1,920	0,333	1,559	0,402	1,261	0,377	0,647	0,396	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
10 µg/ml	1,777	0,352	1,233	0,372	0,880	0,344	0,441	0,313	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
5 µg/ml	1,509	0,341	1,182	0,359	0,927	0,344	0,451	0,304	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
DILUCIÓN DEL CONJUGADO 1/500											
Concentración de ASL	DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/21		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/51		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/100		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/500		TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUSTRATO
	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)			
20 µg/ml	1,102	0,214	0,732	0,208	0,533	0,199	0,238	0,151	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
10 µg/ml	1,154	0,227	0,778	0,226	0,566	0,190	0,225	0,150	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C
5 µg/ml	1,091	0,248	0,872	0,290	0,647	0,252	0,294	0,218	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	30min ; 37°C

Tabla Nº 6-C. Protocolo de trabajo Nº 3.

PROTOCOLO DE TRABAJO Nº 3											
DILUCIÓN DEL CONJUGADO 1/100											
Concentración de ASL	DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/21		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/51		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/100		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/500		TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUSTRATO
	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)			
20 µg/ml	2,368	0,565	2,197	0,665	1,745	0,655	1,020	0,680	1 hora; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C
10 µg/ml	2,029	0,550	1,562	0,587	1,138	0,535	0,741	0,594	1 hora; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C
5 µg/ml	1,725	0,527	1,499	0,628	1,201	0,599	0,702	0,599	1 hora; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C
DILUCIÓN DEL CONJUGADO 1/500											
Concentración de ASL	DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/21		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/51		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/100		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/500		TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUSTRATO
	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)			
20 µg/ml	1,464	0,353	1,141	0,338	0,843	0,302	0,421	0,309	1 hora; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C
10 µg/ml	1,422	0,357	1,038	0,367	0,736	0,341	0,403	0,340	1 hora; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C
5 µg/ml	1,446	0,490	1,173	0,547	0,803	0,540	0,496	0,510	1 hora; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C

Tabla Nº 6-D. Protocolo de trabajo Nº 4.

PROTOCOLO DE TRABAJO Nº 4												
DILUCIÓN DEL CONJUGADO 1/100												
Concentración de ASL	DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/21		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/51		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/100		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/500		TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUSTRATO	
	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)				
20 µg/ml	2,405	0,806	2,368	0,724	2,063	0,720	1,649	1,100	2 horas; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	
10 µg/ml	2,198	0,648	2,102	0,543	1,523	0,639	1,316	0,890	2 horas; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	
5 µg/ml	1,982	0,498	1,895	0,474	1,678	0,474	0,920	0,539	2 horas; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	
DILUCIÓN DEL CONJUGADO 1/500												
Concentración de ASL	DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/21		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/51		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/100		DILUCIÓN DE LA MUESTRA 1/500		TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUERO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL CONJUGADO	TIEMPO Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DEL SUSTRATO	
	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)	SUERO (+)	SUERO (-)				
20 µg/ml	1,612	0,379	1,524	0,353	1,297	0,385	0,699	0,480	2 horas; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	
10 µg/ml	1,593	0,401	1,618	0,352	1,242	0,346	0,655	0,370	2 horas; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	
5 µg/ml	1,418	0,465	1,414	0,448	1,114	0,430	0,553	0,391	2 horas; 37°C	1 hora; 37°C	30min ; 37°C	

i. Tapizado de las microplacas de ELISA

Para lograr un buen tapizado de la superficie de los pocillos de la microplacas se emplearon diferentes concentraciones de ASL (20,10 y 5 $\mu\text{g/ml}$) y en base a los resultados obtenidos se vio por conveniente utilizar la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ para la estandarización del ELISA indirecto que mide anticuerpos anti IgG (tabla N°6).

De la misma manera, se probaron dos tampones para realizar las diluciones del ASL estos fueron el tampón Carbonato / bicarbonato 0,01M, pH 9,6 y el tampón Fosfato salino 0,01 M, pH 7.4 (NaCl 0,15 M). Para realizar el postapizado también se evaluaron dos soluciones, PBS . BSA al 0,1 % y PBS . Leche Morinaga al 5 %.

En el caso de los tampones para realizar la dilución del ASL no existió mucha diferencia entre los resultados de DO obtenidos, y en base a los mismos se tomó la decisión de utilizar el tampón Carbonato / bicarbonato. En el caso del postapizado se decidió utilizar la solución PBS . BSA al 0,1 % (Tabla N° 7).

Tabla N°7. Valores promedio de las densidades ópticas obtenidas en el postapizado de los micropozos con los dos tampones de postapizado utilizados en una prueba de ELISA.

	CONCENTRACIÓN DE ASL					
	20 $\mu\text{g/ml}$		10 $\mu\text{g/ml}$		5 $\mu\text{g/ml}$	
	M (+)	M (-)	M (+)	M (-)	M (+)	M (-)
POSTAPIZADO CON PBS - LECHE MORINAGA al 5%	FUERA DE RANGO TM	0,522	2,458	0,421	2,285	0,331
POSTAPIZADO CON PBS Æ BSA al 0,1%	1,813	0,402	1,741	0,332	1,710	0,277

« En los tres experimentos realizados el equipo no pudo dar un valor de DO por que la intensidad de color de la reacción era mayor a 490nm.

Los ensayos se realizaron por triplicado y se muestran los valores promedio de las DO obtenidas en el postapizado. Se pudo evidenciar que con el tampón PBS . Leche morinaga al 5% las DO de los sueros positivos eran elevadas y lo mismo ocurrió con las DO de los sueros negativos, que resultaron ser más elevadas de lo que se obtenían al utilizar el

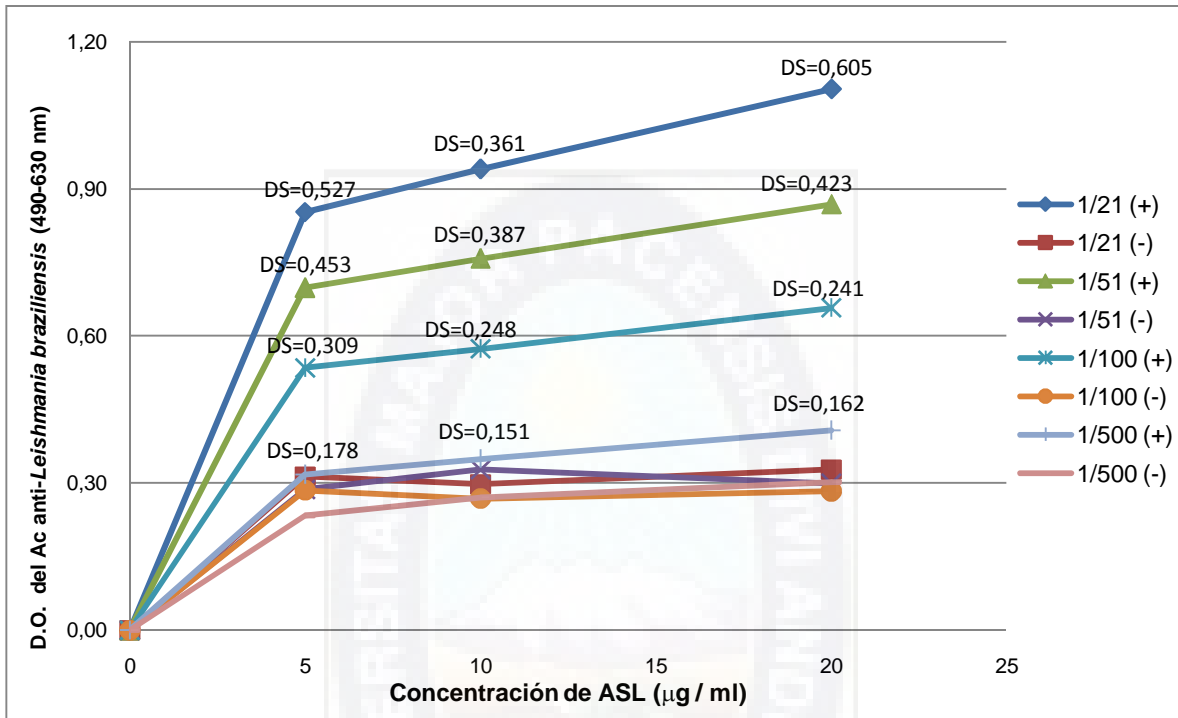
tampón PBS . BSA 0,1%. Se observa también una buena discriminación entre los valores de DO entre sueros positivos y negativos en ambos casos.

ii. Titulación del anticuerpo anti-*Leishmania* y del conjugado para la técnica ELISA

Generalmente se acepta que para una buena discriminación de muestras control positivo y control negativo, el control positivo debe tener densidades ópticas (DO) iguales o mayores a 0,800 y el control negativo DO iguales o menores a 0,300. Este nivel de diferenciación fue el que nos propusimos conseguir mediante la manipulación de los tiempos de incubación, las diluciones de los sueros control y del conjugado. Los resultados del valor promedio de 3 experimentos para cada condición evaluada se muestran en las figuras 14 . 21 y tabla 8.

En la gráfica 2 se observa que, bajo las condiciones de trabajo del protocolo N° 1 utilizadas; a dilución del conjugado 1/100, tiempos de incubación de las muestras de 30 minutos, 30 minutos del conjugado y 30 minutos del sustrato, los controles negativos (-) tienen DO mayores a las deseadas. También, se puede observar que las desviaciones estándar (DS) conseguidas en el caso de los controles positivos (+) son altas, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS mínimo (min)= 0,361; DS máximo (máx)=0,605; para la dilución 1/51 DS(min)=0,387; DS(máx)= 0,453; para la dilución 1/100 DS(min)=0,241; DS(máx)= 0,309; para la dilución 1/500 DS(min)=0,151; DS (máx)= 0,178. En el caso de los controles negativos (-) las desviaciones estándar también son altas, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS(min)= 0,157; DS(máx)=0,313; para la dilución 1/51 DS(min)=0,110; DS(máx)= 0,180; para la dilución 1/100 DS(min)=0,082; DS(máx)= 0,120; para la dilución 1/500 DS(min)=0,104; DS(máx)= 0,172.

Gráfica N°2. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 30 min, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 1 y a una dilución del conjugado 1:100

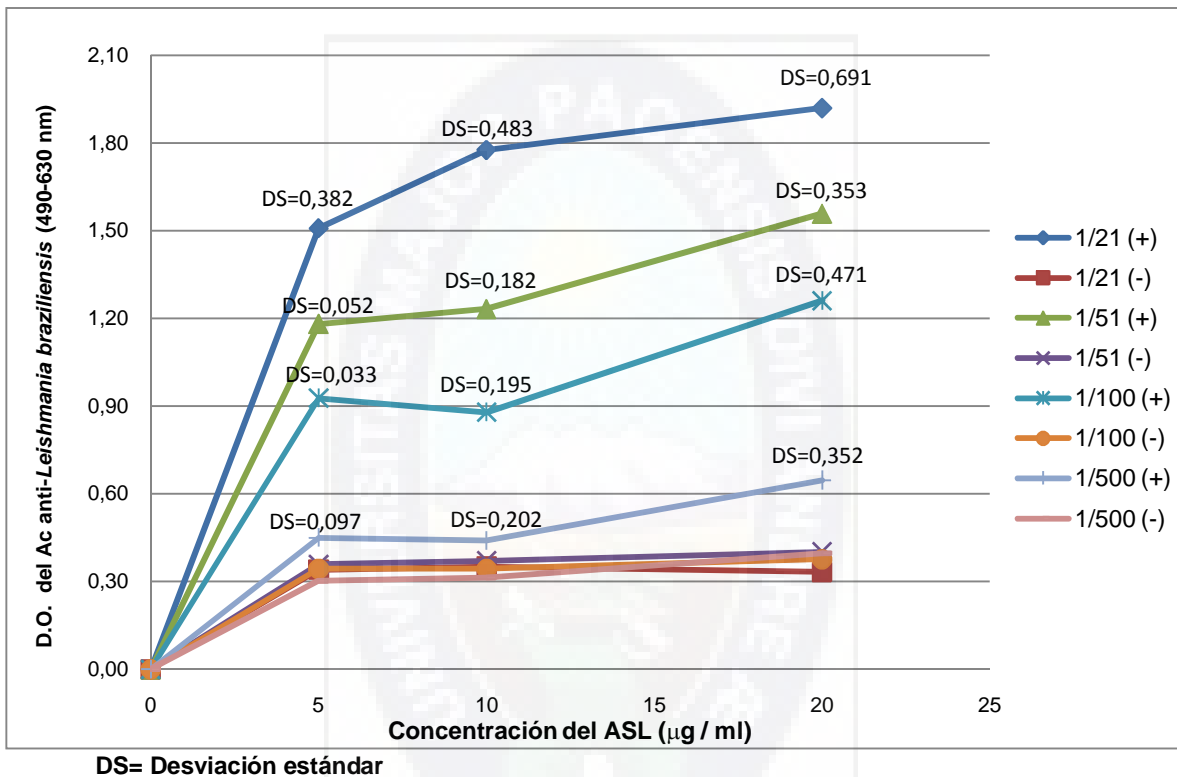


DS= Desviación estándar

En la gráfica 3 se observa que bajo las condiciones de trabajo del protocolo N° 2 utilizadas; a dilución del conjugado 1/100, tiempos de incubación de las muestras de 1 hora, 30 minutos del conjugado y 30 minutos del sustrato, se observa que los controles negativos (-) tienen DO mayores a las deseadas, también se puede observar que las desviaciones estándar (DS) conseguidas, en el caso de los controles positivos (+) son altas, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS mínimo (min)= 0,382; DS máximo (máx)=0,691; para la dilución 1/51 DS(min)=0,052; DS(máx)= 0,353; para la dilución 1/100 DS(min)=0,033; DS(máx)= 0,471; para la dilución 1/500 DS(min)=0,097; DS (máx)= 0,352. En el caso de los controles negativos (-) las desviaciones estándar también son altas, con excepción de la concentración de ASL a 5 µg/ml, en donde se encontraron DS bajas a todas las diluciones del control; teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS(min)= 0,042; DS(máx)=0,118; para la dilución 1/51 DS(min)=0,055; DS(máx)= 0,171; para la

dilución 1/100 DS(min)=0,046; DS(máx)= 0,150; para la dilución 1/500 DS(min)=0,020; DS(máx)= 0,201.

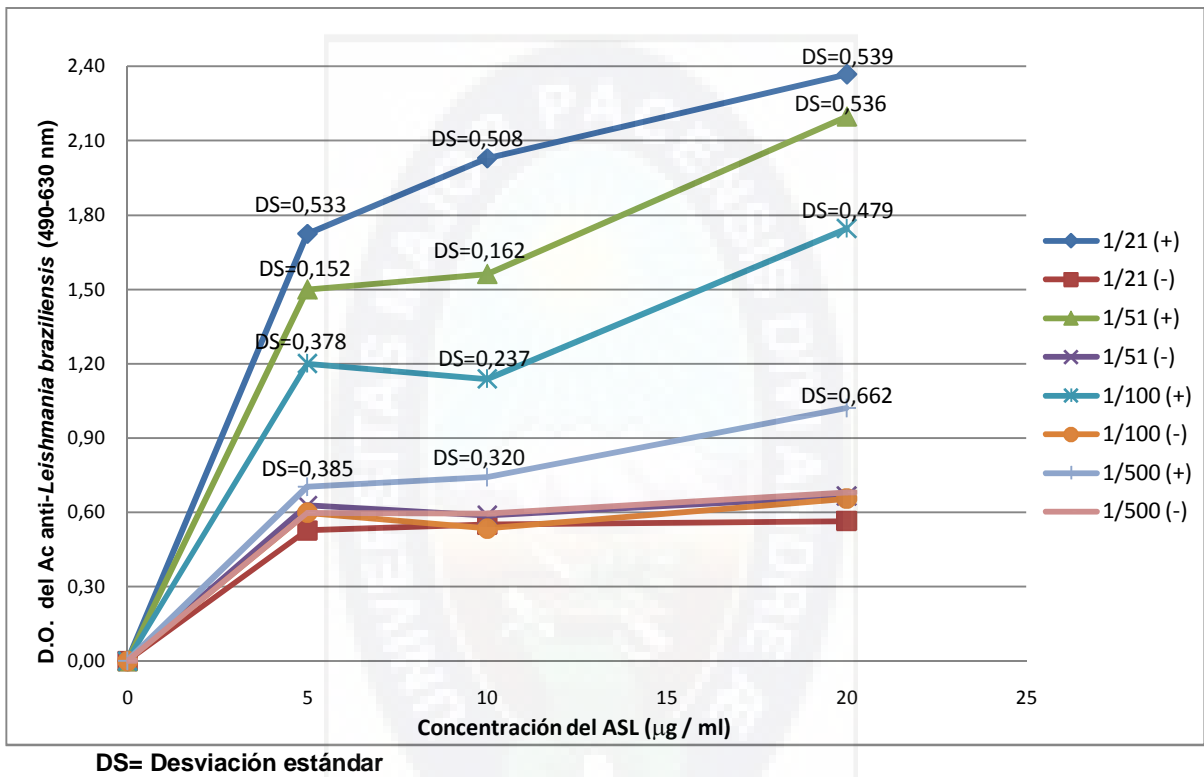
Gráfica Nº 3. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo Nº 2 y a una dilución del conjugado 1:100



En la gráfica 4 se observa que bajo las condiciones de trabajo del protocolo Nº 3 utilizadas; a dilución del conjugado 1/100, tiempos de incubación de las muestras de 1 hora, 1 hora del conjugado y 30 minutos del sustrato, se observa que los controles negativos (-) tienen DO mayores a las deseadas, también se puede observar que las desviaciones estándar (DS) conseguidas, en el caso de los controles positivos (+) son altas, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS mínimo (min)= 0,508; DS máximo (máx)=0,539; para la dilución 1/51 DS(min)=0,152; DS(máx)= 0,536; para la dilución 1/100 DS(min)=0,237; DS(máx)= 0,479; para la dilución 1/500 DS(min)=0,320; DS (máx)= 0,662. En el caso de los controles negativos (-) las desviaciones estándar también son altas, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS(min)= 0,065; DS(máx)=0,185; para la dilución 1/51

DS(min)=0,125; DS(máx)= 0,230; para la dilución 1/100 DS(min)=0,159; DS(máx)= 0,296; para la dilución 1/500 DS(min)=0,322; DS(máx)= 0,452.

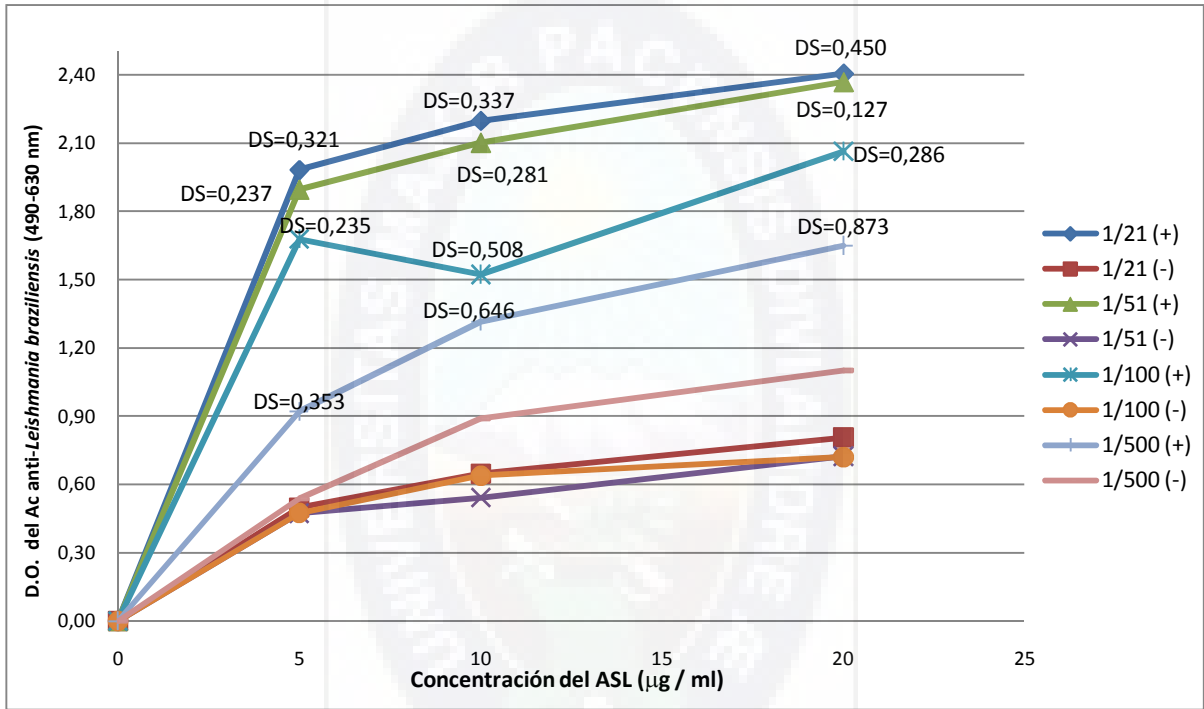
Gráfica N°4. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 1 hora y sustrato 30 min del protocolo N° 3 y a una dilución del conjugado 1:100



En la gráfica 5 se observa que, bajo las condiciones de trabajo del protocolo N° 4 utilizadas; a dilución del conjugado 1/100, tiempos de incubación de las muestras de 2 horas, 1 hora del conjugado y 30 minutos del sustrato, se observa que los controles negativos (-) tienen DO mucho mayores a las deseadas, llegando a casi el doble del valor máximo, también se puede observar que las desviaciones estándar (DS) conseguidas, en el caso de los controles positivos (+) son altas, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS mínimo (min)= 0,321; DS máximo (máx)=0,450; para la dilución 1/51 DS(min)=0,127; DS(máx)= 0,281; para la dilución 1/100 DS(min)=0,235; DS(máx)= 0,508; para la dilución 1/500 DS(min)=0,353; DS (máx)= 0,873. En el caso de los controles negativos (-) las desviaciones estándar también son altas, teniendo en el caso de la dilución 1/21

DS(min)= 0,029; DS(máx)=0,247; para la dilución 1/51 DS(min)=0,048; DS(máx)= 0,165; para la dilución 1/100 DS(min)=0,033; DS(máx)= 0,201; para la dilución 1/500 DS(min)=0,172; DS(máx)= 0,584.

Gráfica N°5. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 2 horas, conjugado 1 hora y sustrato 30 min del protocolo N° 4 y a una dilución del conjugado 1:100

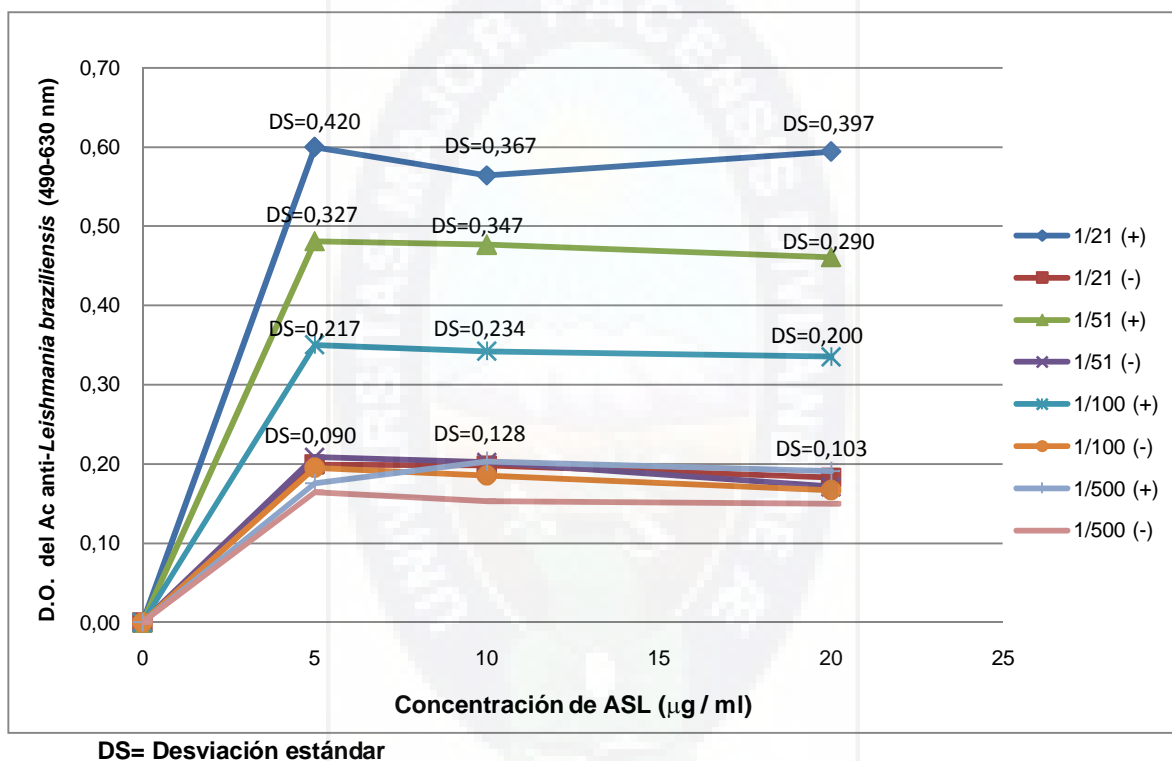


DS= Desviación estándar

En la gráfica 6 se observa que, bajo las condiciones de trabajo del protocolo N° 1 utilizadas; a dilución del conjugado 1/500, tiempos de incubación de las muestras de 30 minutos, 30 minutos del conjugado y 30 minutos del sustrato, se observa que los controles negativos (-) tienen DO menores a 0,300, también se puede observar que las desviaciones estándar (DS) conseguidas, en el caso de los controles positivos (+) no son tan altas en comparación a las DO obtenidas utilizando la dilución del conjugado 1/100, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS mínimo (min)= 0,367; DS máximo (máx)=0,420; para la dilución 1/51 DS(min)=0,290; DS(máx)= 0,347; para la dilución 1/100 DS(min)=0,200; DS(máx)= 0,234; para la dilución 1/500 DS(min)=0,090; DS (máx)= 0,128. En el caso de los controles

negativos (-) las desviaciones estándar también son menores, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS(min)= 0,112; DS(máx)=0,134; para la dilución 1/51 DS(min)=0,101; DS(máx)= 0,147; para la dilución 1/100 DS(min)=0,099; DS(máx)= 0,115; para la dilución 1/500 DS(min)=0,085; DS(máx)= 0,103.

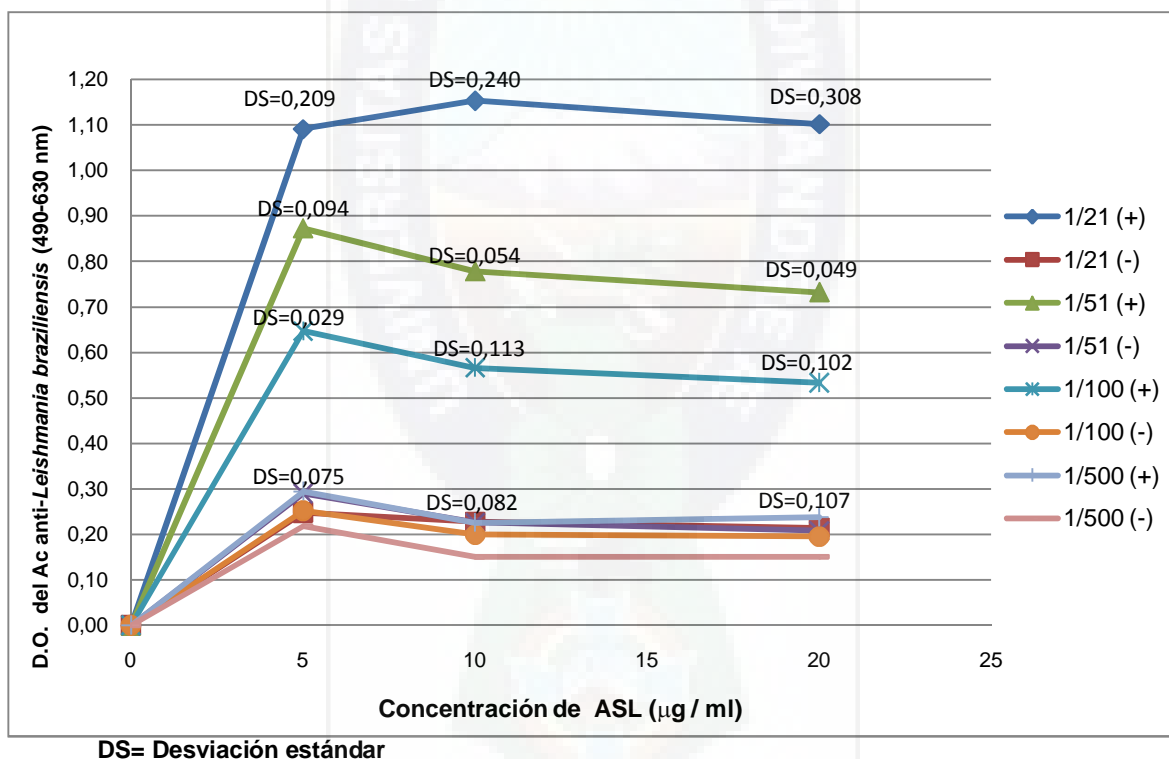
Gráfica N°6. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 30 min, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 1 y a una dilución del conjugado 1:500



En la gráfica 7 se observa que, bajo las condiciones de trabajo del protocolo N° 2 utilizadas; a concentraciones de ASL de 5, 10 y 20µg/ml a dilución del conjugado 1/500, tiempos de incubación de las muestras de 1 hora, 30 minutos del conjugado y 30 minutos del sustrato, en el caso de la dilución de la muestra 1/21 las DO de los sueros positivos y negativos producen DO dentro del rango deseado > 800 para los sueros positivos y < 300 para los sueros negativos, también se observa que los controles negativos (-) tienen DO menores a 0,300 para las demás diluciones y las desviaciones estándar (DS) conseguidas, en el caso de los controles positivos (+) en todos los casos no son tan altas, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS

mínimo (min)= 0,209; DS máximo (máx)=0,308; para la dilución 1/51 DS(min)=0,049; DS(máx)= 0,094; para la dilución 1/100 DS(min)=0,029; DS(máx)= 0,113; para la dilución 1/500 DS(min)=0,075; DS (máx)= 0,107. En el caso de los controles negativos (-) en todos los casos las DO son mucho menores en comparación a todos los experimentos realizados, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS(min)= 0,006; DS(máx)=0,022; para la dilución 1/51 DS(min)=0,015; DS(máx)= 0,021; para la dilución 1/100 DS(min)=0,018; DS(máx)= 0,032; para la dilución 1/500 DS(min)=0,018; DS(máx)= 0,026.

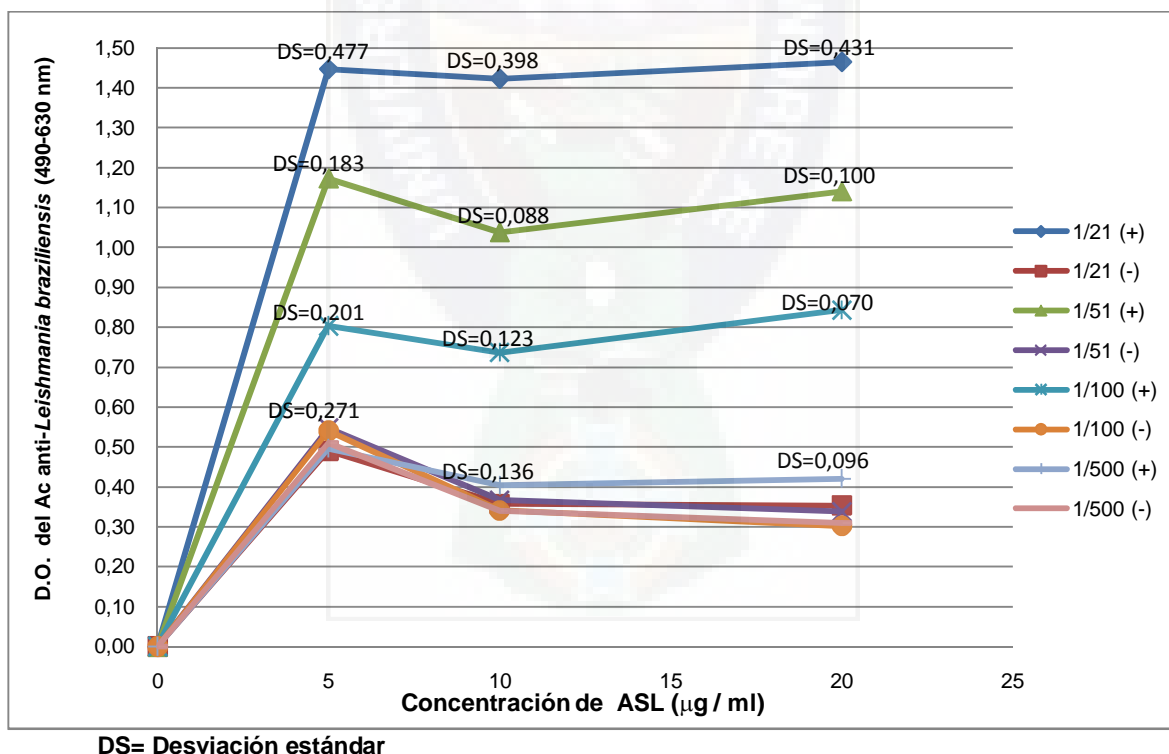
Gráfica N°7. Resultados de D.O de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 2 y a una dilución del conjugado 1:500



En la gráfica 8 se observa que, bajo las condiciones de trabajo del protocolo N° 3 utilizadas; a dilución del conjugado 1/500, tiempos de incubación de las muestras de 1 hora, 1 hora del conjugado y 30 minutos del sustrato, se observa que los controles negativos (-) tienen DO mayores a las deseadas, llegando incluso a ser mayores que los controles positivos en el caso de la dilución 1/500 del control

positivo, también se puede observar que las desviaciones estándar (DS) conseguidas, en el caso de los controles positivos (+) no son tan altas en comparación a las DO obtenidas utilizando la dilución del conjugado 1/100, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS mínimo (min)= 0,398; DS máximo (máx)=0,477; para la dilución 1/51 DS(min)=0,088; DS(máx)= 0,183; para la dilución 1/100 DS(min)=0,070; DS(máx)= 0,201; para la dilución 1/500 DS(min)=0,096; DS (máx)= 0,271. En el caso de los controles negativos (-) también son menores, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS(min)= 0,032; DS(máx)=0,160; para la dilución 1/51 DS(min)=0,027; DS(máx)= 0,161; para la dilución 1/100 DS(min)=0,082; DS(máx)= 0,307; para la dilución 1/500 DS(min)=0,095; DS(máx)= 0,328.

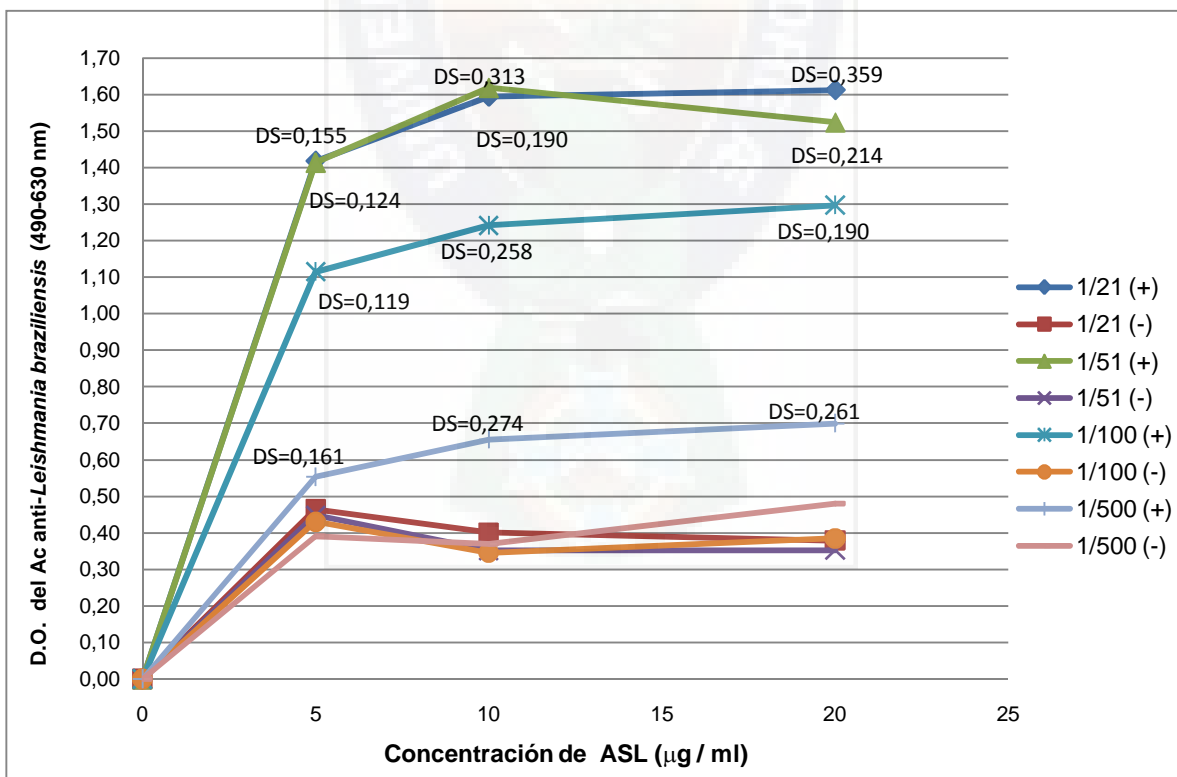
Gráfica N°8. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 1 hora y sustrato 30 min del protocolo N° 3 y a una dilución del conjugado 1:500



En la gráfica 9 se observa que, bajo las condiciones de trabajo del protocolo N° 4 utilizadas; a dilución del conjugado 1/500, tiempos de incubación de las muestras

de 2 horas, 1 hora del conjugado y 30 minutos del sustrato, se observa que los controles negativos (-) tienen DO mayores a las deseadas, también se puede observar que las desviaciones estándar (DS) conseguidas, en el caso de los controles positivos (+) no son tan altas en comparación a las DO obtenidas utilizando la dilución del conjugado 1/100, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS mínimo (min)= 0,155; DS máximo (máx)=0,359; para la dilución 1/51 DS(min)=0,124; DS(máx)= 0,214; para la dilución 1/100 DS(min)=0,119; DS(máx)=0,258; para la dilución 1/500 DS(min)=0,161; DS (máx)= 0,274. En el caso de los controles negativos (-) también son menores, teniendo en el caso de la dilución 1/21 DS(min)= 0,013; DS(máx)=0,046; para la dilución 1/51 DS(min)=0,042; DS(máx)= 0,052; para la dilución 1/100 DS(min)=0,006; DS(máx)= 0,039; para la dilución 1/500 DS(min)=0,077; DS(máx)= 0,189.

Gráfica N°9. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 2 hora, conjugado 1 hora y sustrato 30 min del protocolo N° 4 y a una dilución del conjugado 1:500



DS= Desviación estándar

Tabla N° 8 Resultados de las concentraciones y tiempos ideales de los reactantes utilizados durante la estandarización de la técnica de ELISA indirecto que mide anticuerpos IgG anti-*Leishmania*.

VALORES ÓPTIMOS	CONCENTRACIÓN	DILUCIÓN	TIEMPO DE INCUBACIÓN
ANTÍGENO	10 mg/ml	-----	-----
ANTICUERPO (SUERO)	-----	1/21	1 hora
CONJUGADO	-----	1/500	30 minutos
CROMOGENO/SUSTRATO	2,2 mg/ml / 1,8 μ l/ml	-----	30 minutos

En la tabla 8 se puede observar que las concentraciones ideales de ASL, anticuerpo, conjugado y tiempos de incubación que se deben emplear en la estandarización del ELISA tipo IgG anti-*Leishmania*. Se utilizaron sueros de pacientes con leishmaniasis positivos y negativos previamente confirmados como reactivos o no reactivos por Frotis e Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

c. Estandarización de las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos tipo IgE anti-*Leishmania*

Para estandarizar las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos anti-*Leishmania* tipo IgE se siguieron los siguientes pasos:

i. Pre-tratamiento de los sueros para la eliminación de interferencia por Ac tipo IgG.

Para eliminar la competencia por los sitios activos de los ASL fijados en los pocillos de las microplacas de ELISA por parte de los Ac tipo IgG anti-*Leishmania*, se procedió a precipitarlos con ayuda de anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgG humano con polietilenglicol al 12,5%. Para comprobar esta eliminación de competencia se realizó un experimento previo a la estandarización del ELISA tipo IgE anti-*Leishmania* (Tabla N° 9).

En la tabla 9 se muestran los resultados del experimento previo a la estandarización del ELISA tipo IgE, se puede observar que en los tres sueros

positivos (+) y tres negativos(-) evaluados para este fin, disminuyeron los niveles de DO (sueros tratados con relación a los sin tratar) Teniendo como resultado un porcentaje promedio de disminución de DO de IgG para muestras positivas igual a 43,24% y 18,50% para las muestras negativas. También se muestra que en el caso de la evaluación de los anticuerpos IgE, el tratamiento de los sueros con anticuerpos anti-IgG elimina la interferencia producida por estos anticuerpos, permitiendo una mejor determinación de los anticuerpos IgE anti-*Leishmania*, se observa un porcentaje promedio de disminución de 61,93% para las muestras positivas y 32,0% para las muestras negativas.

Tabla Nº 9. Densidades ópticas de los sueros pre-tratados con anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgG humano y PEG al 12,5% y sueros sin tratar obtenidas en el experimento previo a la estandarización del ELISA IgE anti-*Leishmania*.

MUESTRA	Densidades Ópticas a 490-630nm								
	IgG				IgE				
	C (+) sin Tto	C (+) con Tto	C (-) sin Tto	C (-) con Tto	C (+) sin Tto	C (+) con Tto		C (-) sin Tto	C (-) con Tto
	1/21	1/21	1/21	1/21	1/21	1/21	1/10	1/21	1/21
A	0,945	0,560	0,211	0,161	0,596	0,267	0,252	0,125	0,081
B	1,258	0,636	0,187	0,148	0,740	0,149	0,158	0,122	0,092
C	1,017	0,630	0,203	0,180	0,586	0,315	0,280	0,129	0,083
% promedio de disminución de DO IgG C (+) =					43,24%				
% promedio de disminución de DO IgG C (-) =					18,50%				
% promedio de disminución de DO IgE C (+) =					61,93%				
% promedio de disminución de DO IgE C (-) =					32,00%				

ii. Determinación de las diluciones óptimas de la muestra y del conjugado para la determinación de anticuerpos IgE anti-*Leishmania* por ELISA indirecto.

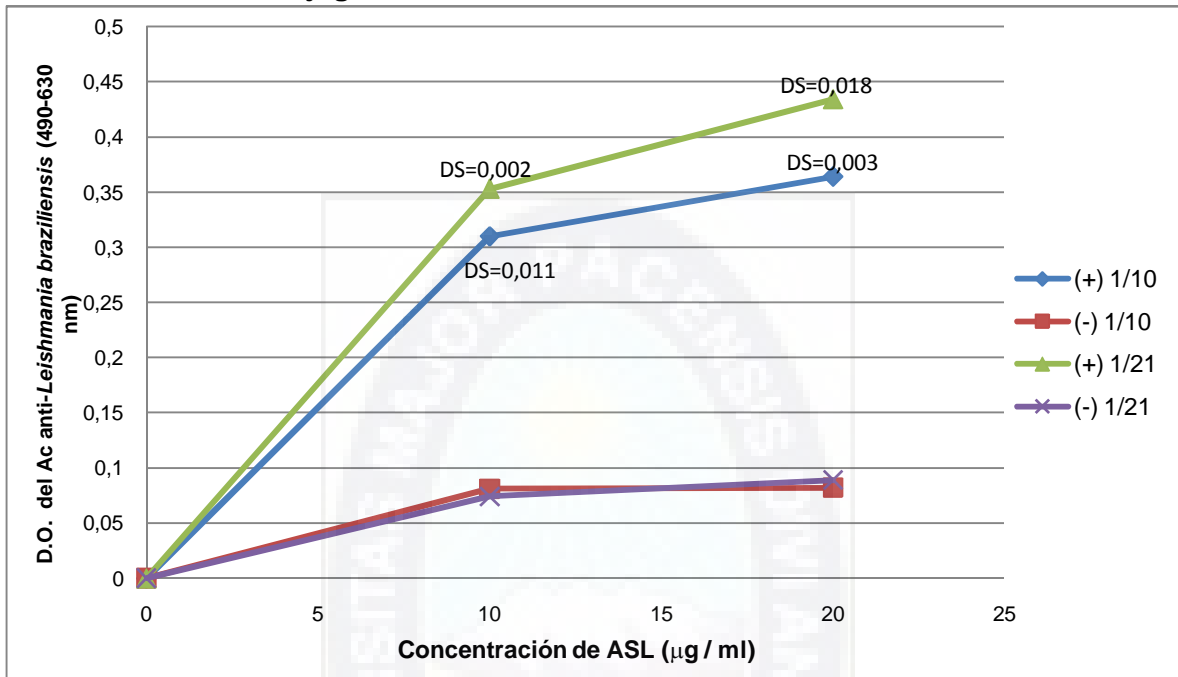
En base a los resultados previos obtenidos en la optimización del ELISA indirecto IgG anti-*Leishmania* y la eliminación previa de la interferencia por Ac-IgG, en la tabla 10 y gráficas 10 y 11 se muestran las pruebas realizados para determinar cuáles son las condiciones óptimas para realizar la determinación de anticuerpos

IgE anti-*Leishmania* por ELISA indirecto. En ellas se observa que la concentración ideal de ASL que permitió discriminar con mayor facilidad la DO entre los sueros positivos y negativos empleados fue de 20 µg/ml, la dilución del suero ideal fue 1/21 y la dilución del conjugado ideal fue 1/100.

Tabla N° 10. Esquema de los experimentos realizados para la determinación de la concentración de ASL, dilución de sueros y conjugados anti-IgE humano ideales para la determinación de anticuerpos tipo IgE anti-*Leishmania*.

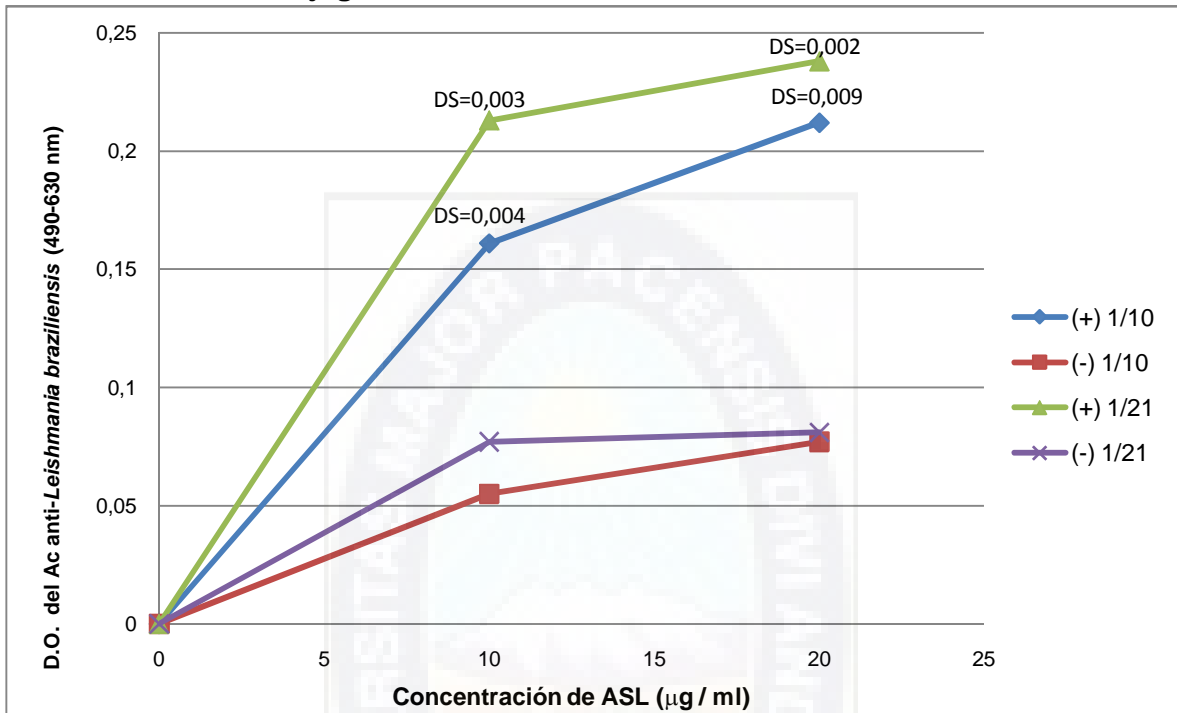
DENSIDAD OPTICA a 490-630nm										
PROTOCOLO N° 2		DILUCIÓN DE CONJUGADO 1/100				DILUCIÓN DE CONJUGADO 1/500				
		Dil. del suero 1/21		Dil. del suero 1/10		Dil. del suero 1/21		Dil. del suero 1/10		
		M (+)	M (-)	M(+)	M(-)	M(+)	M(-)	M(+)	M(-)	
TIEMPOS DE INCUBACION: suero 1 hora -- conjugado 30' - - sustrato 30' (todos los tiempos de incubación a 37°C)	Concentración de ASL	20 µg/ml	0,454	0,084	0,363	0,079	0,239	0,077	0,206	0,075
			0,423	0,090	0,367	0,081	0,239	0,078	0,208	0,074
			0,424	0,094	0,362	0,085	0,235	0,088	0,223	0,082
		\bar{X}	0,434	0,089	0,364	0,082	0,238	0,081	0,212	0,077
	DS	0,018	0,005	0,003	0,003	0,002	0,006	0,009	0,004	
	10 µg/ml	0,355	0,074	0,321	0,074	0,211	0,080	0,158	0,059	
		0,354	0,070	0,300	0,086	0,217	0,080	0,159	0,053	
		0,351	0,077	0,310	0,084	0,212	0,072	0,165	0,054	
		\bar{X}	0,353	0,074	0,310	0,081	0,213	0,077	0,161	0,055
	DS	0,002	0,004	0,011	0,006	0,003	0,005	0,004	0,003	

Gráfica N°10. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 2 y a una dilución del conjugado 1:100



DS= Desviación estándar

Gráfica N°11. Resultados de D.O. de muestras positivas y negativas obtenidos durante la titulación del Ac anti-*Leishmania braziliensis* utilizando los tiempos de incubación del suero 1 hora, conjugado 30 min y sustrato 30 min del protocolo N° 2 y a una dilución del conjugado 1:500



Gráficas 10 y 11. Se observa que a una concentración de ASL de 20 µg/ml en buffer carbonatos, a dilución del suero pre-tratado 1/21 y a dilución 1/100 del conjugado, son los que mejor permiten discriminar entre los resultados positivos (+) y negativos (-).

d. Determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados.

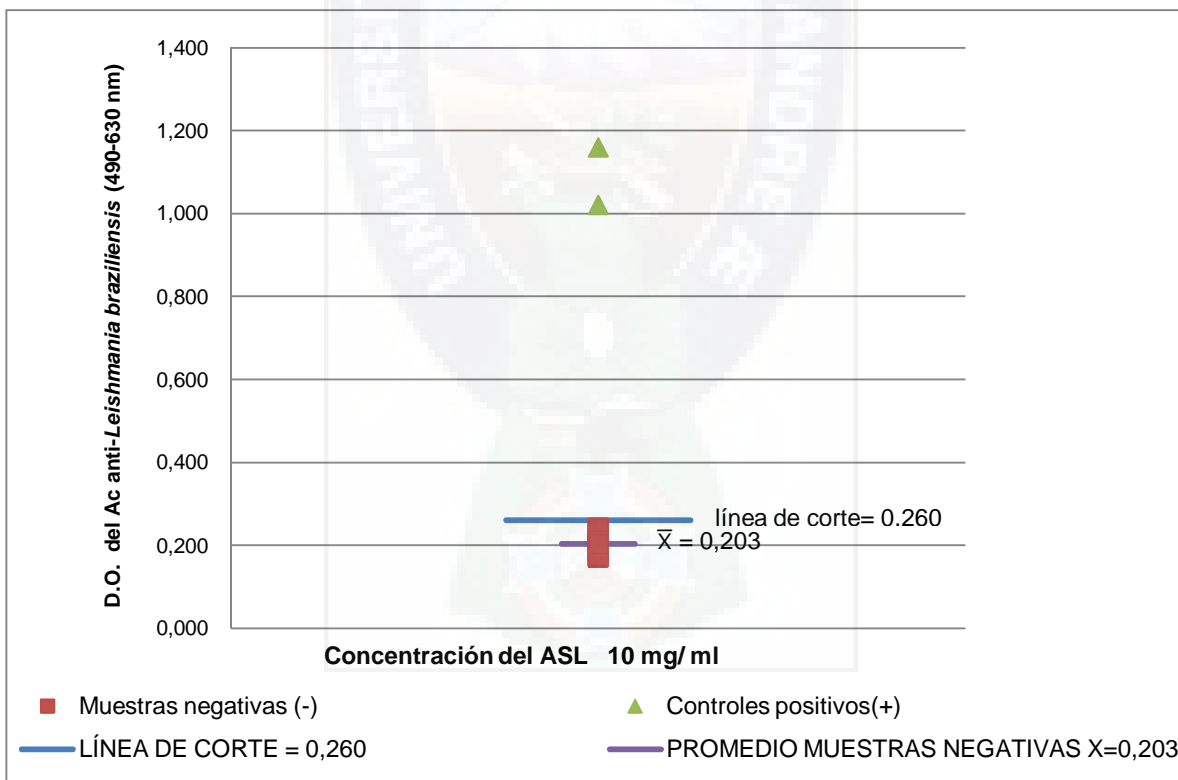
La determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados se realizó de dos maneras: La primera durante la estandarización de la técnica estableciendo los valores promedio más 3 veces la desviación estándar (3 DS) de 50 muestras de suero negativas (clínica y laboratorio) para *Leishmania*, y la segunda estableciendo los valores promedio más 3 DS de 10 muestras negativas

(clínica y laboratorio) para *Leishmania* y 15 muestras positivas (utilizadas como control de calidad) suministradas por el INLASA.

i. Determinación de la línea de corte con muestras negativas para el ELISA IgG anti-*Leishmania*

En la gráfica 12 se muestran los resultados de la determinación de la línea de corte del test procesando 50 muestras negativas cuyo valor promedio fue: $\bar{X} = 0,203$ ($p < 0,05$) y su desviación estándar calculada fue: $DS = 0,019$, para encontrar la línea de corte se le sumó 3 veces la desviación estándar ($3DS = 0,057$) al promedio, teniendo un valor de línea de corte = 0,260.

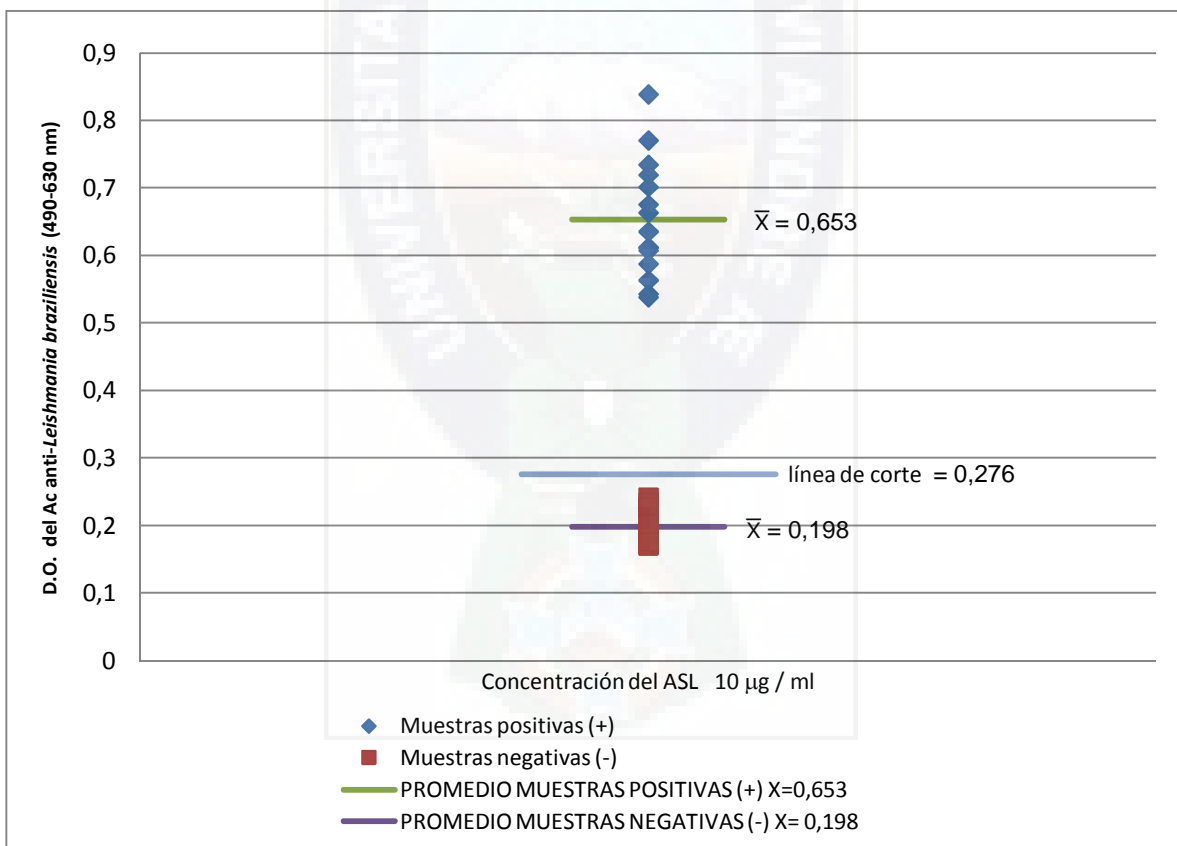
Gráfica N°12. Determinación de la línea de corte del ELISA IgG anti-*Leishmania braziliensis* estandarizada procesando 50 muestras negativas.



En la gráfica 13 se muestran los resultados de la determinación de la línea de corte de la prueba de ELISA IgG anti-*Leishmania* estandarizada. Se utilizaron 15

muestras positivas diferentes a las utilizadas para la estandarización y 10 muestras negativas elegidas al azar de entre las 50 muestras utilizadas para la estandarización de la prueba. El valor promedio de las muestras negativas fue $\bar{X} = 0,198$ ($p < 0,05$) y su desviación estándar calculada fue $DS = 0,026$ para encontrar la línea de corte se le sumó 3 veces la desviación estándar ($3DS = 0,078$) al promedio teniendo un valor de línea de corte = $0,276$. En el caso de las muestras positivas estas se utilizaron como control de calidad de la prueba encontrando un valor promedio $\bar{X} = 0,653$ ($p < 0,05$) y su desviación estándar calculada fue $DS = 0,087$.

Gráfica N°13. Determinación de la línea de corte de la prueba de ELISA IgG anti-*Leishmania braziliensis* estandarizada, procesando 10 muestras negativas y 15 muestras positivas (como control de calidad).

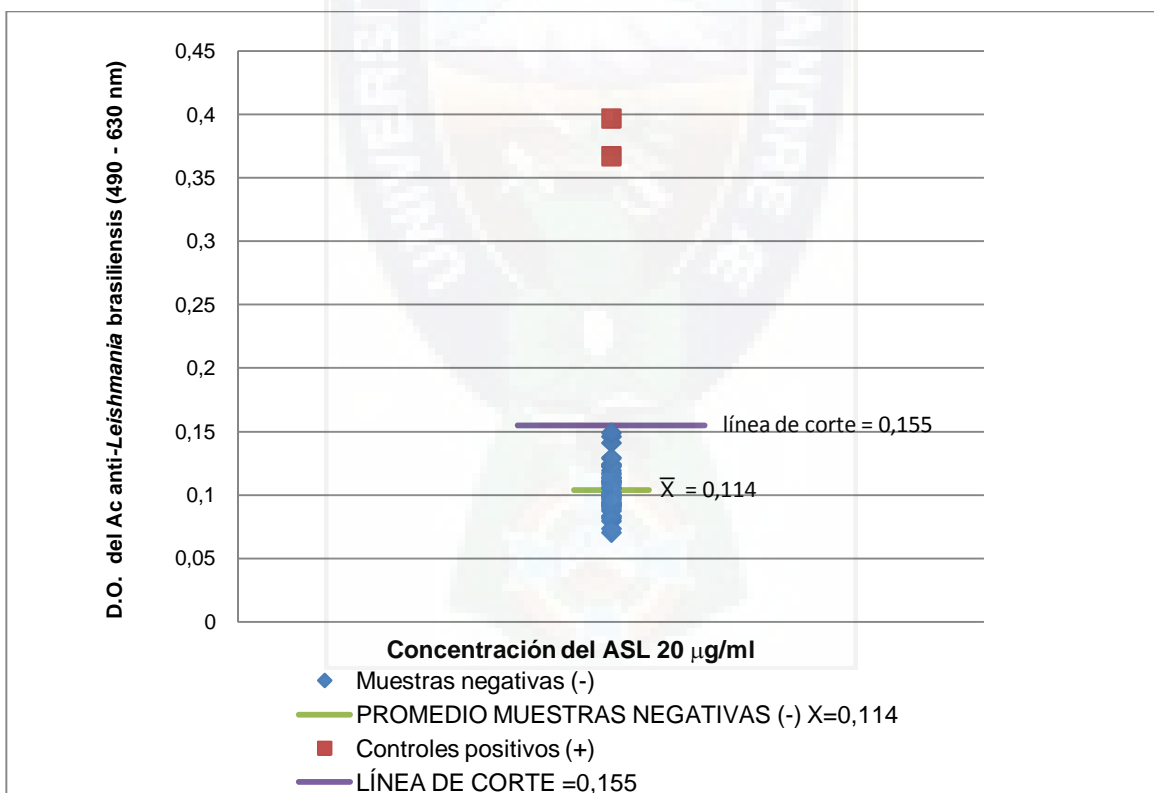


ii. Determinación de la línea de corte con muestras negativas para el ELISA IgE anti-*Leishmania*

Los procedimientos y los criterios utilizados para determinar la línea de corte fueron los mismos empleados para la determinación de la línea de corte del ELISA IgG anti-*Leishmania*.

En la gráfica 14 se muestran los valores promedio y desviación estándar obtenidos para la línea de corte del test procesando 50 muestras negativas cuyo valor promedio fue: $\bar{X} = 0,114$ ($p < 0,05$) y su desviación estándar calculada fue: $DS = 0,017$, para encontrar la línea de corte se le sumó 3 veces la desviación estándar ($3DS = 0,051$) al promedio teniendo un valor de línea de corte = $0,155$.

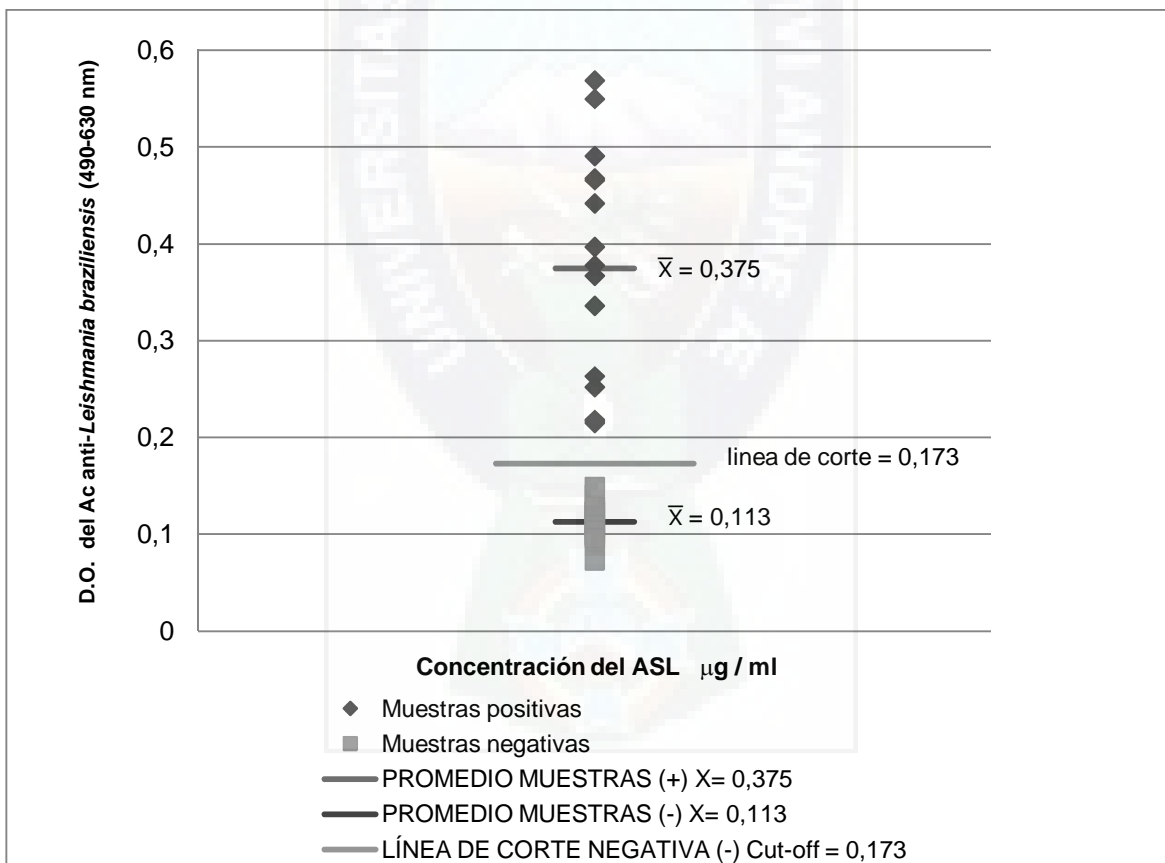
Gráfica N°14. Determinación de la línea de corte del ELISA IgE anti-*Leishmania braziliensis* estandarizada, procesando 50 muestras negativas.



En la gráfica 15. se muestran los resultados de la determinación de la línea de corte de la prueba de ELISA IgE anti-*Leishmania* estandarizada. Se utilizaron 15

muestras positivas diferentes a las utilizadas para la estandarización y 10 muestras negativas elegidas al azar de entre las 50 muestras utilizadas para la estandarización de la prueba. El valor promedio de las muestras negativas fue $\bar{X}=0,113$ ($p < 0,05$) y su desviación estándar calculada fue $DS=0,020$ para encontrar la línea de corte se le sumó 3 veces la desviación estándar ($3DS=0,060$) al promedio teniendo un valor de línea de corte = 0,173. En el caso de las muestras positivas estas se utilizaron como control de calidad de la prueba encontrando un valor promedio $\bar{X}=0,375$ ($p < 0,05$) y su desviación estándar calculada fue $DS=0,122$.

Gráfica N°15. Determinación de la línea de corte de la prueba de ELISA IgE anti-*Leishmania braziliensis* estandarizado, procesando 10 muestras negativas y 15 muestras positivas (como control de calidad).



e. Determinación de la repetitividad de resultados del estudio

Para esta determinación se evaluaron dos sueros control, uno positivo y uno negativo tomados al azar de entre los sueros utilizados durante la estandarización del ELISA indirecto IgG anti-*Leishmania*. En la tabla 11 se muestran los resultados de las densidades ópticas obtenidas en los cinco análisis realizados por duplicado (de los mismos sueros control positivo y negativo), con intervalos de 48 horas entre cada análisis, bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura, con un valor promedio de DO $\bar{X}=0,877$ ($p < 0,05$); una desviación estándar $DS=0,008$ y un coeficiente de variación $CV=0,010$ para los controles positivos y un valor promedio de DO $\bar{X}=0,221$ ($p < 0,05$); una desviación estándar $DS=0,003$ y un coeficiente de variación $CV=0,015$ para los controles negativos.

Tabla N°11. Resultados de las densidades ópticas obtenidas de los cinco análisis realizados a los mismos sueros control positivo y negativo a diferentes tiempos.

REPETITIVIDAD DEL ESTUDIO				
	Suero (+)	PROMEDIO \bar{x}	Suero (-)	PROMEDIO \bar{x}
ANALISIS 1 Tiempo 0	0,886	0,885	0,214	0,218
	0,883		0,221	
ANALISIS 2 a 48 horas	0,867	0,869	0,222	0,220
	0,871		0,217	
ANALISIS 3 a 96 horas	0,879	0,884	0,227	0,223
	0,888		0,219	
ANALISIS 4 a 144 horas	0,875	0,880	0,224	0,220
	0,884		0,215	
ANALISIS 5 a 192 horas	0,869	0,867	0,221	0,226
	0,864		0,231	
PROMEDIO de \bar{x}		0,877		0,221
DS		0,008		0,003
CV		0,010		0,015

f. Determinación de la correlación de resultados del ELISA IgG estandarizado frente a otro método de ELISA comercial r-biopharm®.

Para la determinación del grado de correlación de resultados de los dos ELISAs indirectos se utilizaron 15 muestras positivas (diferentes a las utilizadas en la estandarización) y 10 negativas (elegidas al azar de entre las 50 negativas utilizadas en la estandarización) las mismas que se procesaron de acuerdo a las condiciones de trabajo del ELISA estandarizado y el ELISA comercial.

En la tabla 12 se observa que existió un 100% de correlación de resultados positivos (S=100%) y negativos (E=100%) de los métodos evaluados con un índice de correlación de *Kappa* de 1 ($p < 0,05$) lo que equivale a una muy buena correlación de resultados entre los dos métodos en estudio⁽⁴⁰⁾.

Tabla Nº12. Determinación de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la Técnica ELISA estandarizada frente al ELISA comercial r-biopharm® (Ver anexo 10).

		MUESTRAS PROCESADAS POR EL ELISA COMERCIAL RIDASCREEN-BIOPHARM®		
		POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
MUESTRAS PROCESADAS POR EL ELISA ESTANDARIZADO	POSITIVOS	15	0	15
	NEGATIVOS	0	10	10
TOTAL		15	10	25

Sensibilidad = 100 % VVP = 100%

Especificidad = 100 % VPN = 100%

Índice *Kappa* = 1

En la tabla 13 se pueden observar las densidades ópticas obtenidas por los dos métodos evaluados, las muestras utilizadas, tanto los sueros positivos como los sueros negativos fueron los mismos para ambos casos, se puede ver que en el caso de los sueros positivos existe una diferencia no mayor a 0,180 y para los sueros negativos la diferencia no es mayor a 0,100 (resaltado en la tabla 13).

Tabla Nº 13. Resultados de las densidades ópticas obtenidas por los dos ELISAs evaluados.

CORRELACION DE RESULTADOS			
M(+) ELISA ESTANDARIZADO	M(+) ELISA COMERCIAL	M(-) ELISA ESTANDARIZADO	M(-) ELISA COMERCIAL
0,734	0,562	0,227	0,155
0,924	0,744	0,241	0,237
0,543	0,442	0,185	0,085
0,612	0,615	0,172	0,180
0,663	0,805	0,191	0,116
0,701	0,741	0,172	0,129
0,750	0,574	0,170	0,102
0,563	0,564	0,176	0,139
0,675	0,830	0,172	0,114
0,719	0,718	0,201	0,108
0,607	0,658		
0,538	0,482		
0,611	0,451		
0,635	0,472		
0,587	0,524		
$\bar{X} = 0,657$	$\bar{X} = 0,612$	$\bar{X} = 0,191$	$\bar{X} = 0,137$

XII. DISCUSIÓN

a. Obtención del antígeno soluble de *Leishmania* (ASL)

La bibliografía científica plantea diferentes métodos para la obtención de antígeno soluble de *Leishmania*, cada uno de ellos presenta características peculiares, como los métodos propuestos por K. Anam y colaboradores.⁽³¹⁾ y V. Iniesta⁽³⁰⁾ en los cuales basamos nuestro método de obtención de ASL, según la disponibilidad de equipos y reactivos.

En los estudios realizados por K. Anam y colaboradores. y V. Iniesta se plantea que para la obtención del ASL los promastigotes deben estar en fase estacionaria de crecimiento, y se debe realizar la cosecha de los mismos después del tercer o cuarto ~~base de cultivo~~ ^{base de cultivo}⁽³¹⁾, luego, se deben lisar los parásitos utilizando un sonicador, técnica utilizada por ambos investigadores, después de este paso se encuentra una diferencia entre ambos protocolos: en el estudio de V. Iniesta se plantea que, la muestra total sonicada debe ser cuantificada para determinar la concentración de proteínas, sin embargo, K. Anam, plantea que después del sonificado de la muestra, esta debe ser centrifugada a 4300 g (6800 rpm) para obtener el antígeno soluble de *Leishmania*. Nosotros realizamos la evaluación de ambos protocolos con pequeñas modificaciones en base a nuestra disponibilidad de reactivos y equipos. En el primer caso mantuvimos las condiciones de trabajo propuestas por V. Iniesta, utilizando el PBS celular como buffer de lavado y como solución para el sonificado, el tiempo de sonicación con intervalos de 1 minuto entre cada ciclo y cambiamos el método de cuantificación de proteínas de Bradford por el de Lowry. En el segundo caso, en el estudio de K. Anam, mantuvimos el PBS celular utilizado como tampón de lavado y utilizamos el mismo PBS celular como solución para el sonificado en lugar del tampón Tris utilizado por este investigador, y mantuvimos la cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

Como resultado encontramos que si bien existe una relación directamente proporcional entre el número de células/ml y la concentración de proteínas obtenidas a partir de cultivos de promastigotes en fase estacionaria de crecimiento

por ambos protocolos propuestos (tabla N° 4), en la práctica pudimos evidenciar que el segundo protocolo brindaba mejores resultados.

Utilizando el primer protocolo en evaluación, luego de verificar la ausencia de promastigotes en solución se procedió a la cuantificación por el método de Lowry obteniendo concentraciones de entre 18 a 29 $\mu\text{g/ml}$ de proteínas de ASL (tabla N°4). Después se realizó el tapizado de las placas de ELISA a concentraciones de 20, 10, 5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ y se procesaron muestras positivas y negativas utilizando los reactivos del kit comercial r-biopharm (utilizado para la correlación de resultados) más sus controles positivo y negativo obteniendo como resultado que no existía mucha diferencia entre los valores de absorbancia entre positivos y negativos y que la DO de las muestras negativas eran muy altas (tabla N°5), se realizó este mismo método de obtención de ASL y procesamiento de muestras por 3 veces más obteniendo los mismos resultados. Al no obtener buenos resultados, se propuso un segundo protocolo, en el que después de obtener la solución sonicada de promastigotes, esta debía ser centrifugada a 6800 rpm por 15 min⁽³¹⁾ y recién debía ser cuantificada por el método de Lowry, obteniendo una concentración de proteínas de entre 110 y 235 $\mu\text{g/ml}$ (tabla N° 4), se realizó el mismo procedimiento utilizado con el primer protocolo, obteniendo en este caso buena diferenciación entre las D.O. de las muestras positivas y negativas y teniendo también resultados de muestras negativas dentro del rango especificado por el kit comercial r-biopharm® de $<0,300$ (tabla N°5).

La diferencia de resultados obtenidos entre el primer y segundo protocolo evaluado, radica en la presencia de impurezas presentes en la solución sonicada, cuantificada y utilizada para el tapizado de las placas de ELISA, las mismas que eran reconocidas de manera inespecífica (reacción cruzada) por anticuerpos IgG diferentes a los anticuerpos IgG dirigidos contra *Leishmania* (ASL) presentes en el suero, conduciendo de esta manera a un incremento de las absorbancias de las muestras negativas, o dicho de otra manera induciendo resultados falsos positivos en el ensayo.

b. Optimización de las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos tipo IgG anti-*Leishmania braziliensis*

i. Tapizado de las microplacas de ELISA

Basados en los estudios realizados por S. Iñiguez⁽³⁾ y V. Iniesta⁽³⁰⁾, evaluamos cual era el mejor protocolo para el tapizado de los micropozos de las placas de ELISA. Para realizar las diluciones del ASL, se evaluaron dos tampones, estos fueron el tampón Carbonato / bicarbonato 0,01M, pH 9,6 y el tampón Fosfato salino 0,01 M, pH 7.4 (NaCl 0,15 M) y para recubrir los sitios de los pocillos en los que el ASL no había sido absorbido se realizó el postapizado utilizando dos soluciones el PBS . BSA al 0,1% y PBS . Leche Morinaga al 5 %, de las cuales también evaluamos cual era la más adecuada.

Los resultados de esta parte experimental nos mostraron que no existe diferencia significativa al utilizar tampón fosfatos o tampón carbonatos como diluyente del ASL. 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 con respecto al tampón PBS-BSA. En el caso del ASL a 20 µg/ml se obtuvieron lecturas de DO por encima del rango de lectura del espectrofotómetro a longitud de onda de 490nm, por la alta intensidad de color de la reacción. En el caso de la solución de PBS . BSA al 0,1% se obtuvieron valores de absorbancia que se mantenían dentro del espectro de lectura del equipo a 490nm y las DO tanto de las muestras positivas como de las negativas eran más bajas con relación al otro tampón evaluado. Si bien la bibliografía consultada expresa que ambas soluciones utilizadas para el bloqueo o tapizado de sitios inespecíficos de unión son las que más se recomiendan y utilizan para este fin, la leche descremada debe estar libre de grasa y mejor aun se recomienda utilizar caseína pura para tener un mejor efecto bloqueante de sitios inespecíficos en las microplacas^(41;42), las diferencias de resultados obtenidos entre ambas soluciones podrían deberse a estos detalles, ya que la leche utilizada para el ensayo tenía en su composición una concentración de grasa de 3,51 gramos por

cada 100 ml de solución normal, que es el doble que el de las proteínas (en el que se incluye la caseína) con solo 1,69 gramos por cada 100ml de solución normal.

Las concentraciones evaluadas del ASL fueron 20, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$. De acuerdo a los resultados obtenidos en la tabla 6, se determinó que a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, se obtiene una mejor discriminación entre los resultados positivos y negativos. Si bien los investigadores S. Iñiguez y K. Anam, trabajaron con métodos de obtención de ASL similares al nuestro (solo con el sobrenadante luego de centrifugar la muestra sonicada), la concentración de ASL que utilizaron en sus estudios fueron de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, lo cual difiere de los resultados obtenidos en el presente estudio.

ii. Titulación del anticuerpo anti-*Leishmania braziliensis* y del conjugado anti IgG humano marcado con peroxidasa para la técnica ELISA

Para determinar a qué dilución de suero (1/21; 1/51; 1/100; 1/500) y dilución del conjugado (1/100 y 1/500) se debería trabajar, se propuso evaluar 4 protocolos de trabajo cuya diferencia entre ellos radica en los tiempos de incubación y diluciones a utilizar, tanto del suero como del conjugado (tabla 6 A-D). Las diluciones de los sueros control, conjugado y tiempos de incubación a evaluar se hicieron en base a estudios previos publicados^(3,30,31,33) y a la experiencia de nuestro laboratorio en la realización de ELISAs para diagnóstico de otras patologías.

En el caso del primer protocolo, utilizando las diluciones del conjugado (1/100, 1/500) los resultados nos mostraron que los tiempos de incubación eran muy cortos tanto para el suero como para el conjugado, ya que las densidades ópticas obtenidas para el suero control positivo eran bajas para todas las diluciones evaluadas del suero (1/21, 1/51, 1/100 y 1/500), las desviaciones estándar obtenidas en todos los casos (gráficas 2 y 6) eran mayores a las obtenidas por el segundo protocolo (gráfica 7). En cuanto a los sueros control negativo se observó que a dilución 1/100 del conjugado las DO obtenidas de todas las diluciones de muestras control evaluadas eran mayores a las deseadas, en ambos casos

(controles positivos y negativos) encontramos coeficientes de variación (CV) elevados, teniendo un mínimo de $CV=0,516$ a dilución del suero de 1/500 y un máximo de $CV=0,720$ a dilución del suero de 1/51 en el caso de los controles positivos; en el caso de los controles negativos encontramos un mínimo de $CV=0,516$ a dilución del suero de 1/500 y un máximo de $CV=0,727$ a dilución del suero de 1/51, por tanto, estas condiciones de trabajo no eran las adecuadas para conducir una prueba de ELISA.

En el caso de los protocolos 3 y 4 encontramos que los tiempos de incubación tanto del suero como del conjugado eran demasiado largos, ya que los valores de absorbancia para el control negativo estaban por encima del rango deseado (<300). También se observó en el caso del tercer protocolo que, a concentración de ASL de $5 \mu\text{g/ml}$ con una dilución del suero de 1/500 y dilución del conjugado 1/500, el valor de DO de la muestra control negativa era mayor que de la muestra control positiva. En cuanto a los coeficientes de variación, encontramos que en estos dos protocolos, estos valores eran menores que los obtenidos en el primer protocolo en ambos casos (controles positivos y negativos) encontramos coeficientes de variación (CV) con un mínimo de $CV=0,083$ a dilución del suero de 1/100 (protocolo 3); $CV=0,088$ a dilución del suero de 1/51 (protocolo 4); y un máximo de $CV=0,545$ a dilución del suero de 1/500 y $CV=0,418$ a dilución del suero de 1/500 respectivamente en el caso de los controles positivos; en el caso de los controles negativos encontramos un mínimo de $CV=0,080$ a dilución del suero de 1/51 (protocolo 3) y $CV=0,016$ a dilución del suero de 1/100 (protocolo 4); y un máximo de $CV=0,643$ a dilución del suero de 1/500 y $CV=0,393$ a dilución del suero de 1/500 respectivamente, por tanto, estas condiciones de trabajo no eran las adecuadas para conducir una prueba de ELISA.

Al trabajar con el segundo protocolo con tiempos de incubación de los sueros control de 1 hora, del conjugado 30 minutos y del sustrato 30 minutos y a una dilución del conjugado de 1/500, se obtuvieron buenos resultados, vale decir mayor discriminación entre resultados positivos y negativos y con valores de absorbancia dentro de los rangos que nos habíamos propuesto de $>0,800$ para los positivos y $<0,300$ para los controles negativos (tabla 6 B), pero no ocurrió lo mismo cuando se

trabajó con la dilución del conjugado 1/100 a todas las diluciones del control y todas las concentraciones del ASL, con la que se obtuvieron DO mayores a 300 en el caso de las muestras negativas (gráfica 3). Estos rangos fueron tomados como referencia de los rangos de positividad y negatividad propuestos en el kit comercial r-Biopharm. En la gráfica 7 se observa que a una dilución de conjugado de 1/500, a dilución del suero de 1/21, se obtiene los mejores resultados, con una mayor discriminación entre resultados de DO de sueros control positivos y sueros control negativos, lo que no sucedió en los otros protocolos; estos resultados se presentan en las tres concentraciones de ASL propuestas de 20, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$, se observa que las desviaciones estándar (DS) para ambos controles son bajas C(+) DS=0,308; C(-) DS=0,022 para la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$; C(+) DS=0,240; C(-) DS=0,013 para la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y C(+) DS=0,209; C(-) DS=0,006 para la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$; con valores promedio de DO de C(+)=1,102; C(-)=0,214 para 20 $\mu\text{g/ml}$; C(+)= 1,154; C(-)=0,227 para 10 $\mu\text{g/ml}$ y C(+)= 1,091; C(-)= 0,248 para 5 $\mu\text{g/ml}$. Lo mismo ocurrió en cuanto a los coeficientes de variación CV encontrados, con valores mucho menores que los del primer protocolo y un tanto similares en comparación con los protocolos 3 y 4; encontramos un mínimo de CV=0,044 a dilución del suero de 1/100 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de ASL y un máximo de CV=0,449 a dilución del suero de 1/00 y 20 $\mu\text{g/ml}$ de ASL en el caso de los controles positivos; en el caso de los controles negativos encontramos un mínimo de CV=0,025 a dilución del suero de 1/21 a 5 $\mu\text{g/ml}$ de ASL y un máximo de CV=0,174 a dilución del suero de 1/500 a 20 $\mu\text{g/ml}$ de ASL.

Si bien, se tienen diferencias mínimas de DO, DS y CV entre los sueros control, decidimos utilizar la concentración de ASL de 10 $\mu\text{g/ml}$ porque presentó los mejores valores promedio de DO para los sueros, DO más alta en el control positivo y un valor menor al promedio de los controles negativos con relación a las otras dos concentraciones de ASL evaluadas (tabla 6-B, gráfica 7).

Este protocolo resulta ser un híbrido de los protocolos realizados por S. Iñiguez y V. Iniesta, que determinaron que los tiempos ideales para desarrollar el ELISA eran de 2 horas con la muestra, 1 hora del conjugado, 30 minutos del sustrato y 30 minutos

de la muestra, 30 minutos del conjugado, 30 minutos del sustrato, respectivamente. Con diluciones del conjugado de 1/1000 y 1/500 en ambos casos (ya que evaluaron dos subclases de IgG), y en ninguno de los casos se muestra la dilución del suero analizado.

c. Optimización de las condiciones para la determinación de los niveles de anticuerpos tipo IgE anti-*Leishmania brasiliensis*.

i. Pre-tratamiento de los sueros para la eliminación de interferencia por Ac tipo IgG.

Para eliminar la competencia por el sitio activo del determinante antigénico del ASL fijado en los pocillos de las microplacas de ELISA por las inmunoglobulinas de tipo IgG anti-*Leishmania*, se realizó un pre-tratamiento de los sueros control mediante la utilización del método de precipitación de complejos inmunes basado en el uso de polietilenglicol al 12,5%. Tratamos los sueros con anticuerpos IgG monoclonales de ratón anti-IgG humano y polietilenglicol al 12,5% que solo precipita complejos inmunes, en este caso IgG-anti IgG humano. M.L.B. Souza y colaboradores y A.M. Atta utilizaron para este fin anticuerpos IgG anti IgG-humana y reactivo absorbente de factor reumatoideo (RF) que bloquea el sitio de unión del anticuerpo, para eliminar dicha competencia antigénica.

Los resultados del pretratamiento expresados en la tabla 9, nos muestran que tanto para los 3 sueros positivos como para los 3 sueros negativos evaluados existe una disminución promedio de los niveles de DO de IgG del 43,24% y 18,50% respectivamente. En el estudio realizado por AM Atta, se muestra que existe una disminución del 39,2% de disminución para los sueros positivos, no realizaron este análisis para sueros negativos y en el trabajo de E.M. Carvalho si bien realizaron el proceso no se mencionan los resultados. En los estudios de M.L.B. Souza y colaboradores y AM Atta, se muestra que este pre-tratamiento de los sueros elimina la interferencia de los anticuerpos IgG anti-*Leishmania* en la reacción y en

el 100% de los casos estudiados permite una determinación mas real de anticuerpos tipo IgE en relación con otro método de eliminación que solo alcanza el 11%⁽³⁹⁾. En nuestro estudio, también se muestra que en la evaluación de los anticuerpos IgE, el tratamiento de los sueros con anticuerpos anti-IgG elimina la interferencia producida por estos anticuerpos, permitiendo la determinación de los anticuerpos IgE anti-*Leishmania* 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 (tabla 8).

d. Determinación de las diluciones óptimas de la muestra y del conjugado para la determinación de anticuerpos IgE anti-*Leishmania braziliensis* por ELISA indirecto.

Tomando en cuenta los resultados de la estandarización del ELISA IgG anti-*Leishmania* y el pre-tratamiento para la eliminación de interferencia por Ac-IgG, se evaluaron las diluciones del suero 1/10 y 1/21, y las diluciones del conjugado de 1/100 y 1/500. Los experimentos se realizaron por triplicado y se utilizó el mismo el protocolo de trabajo utilizado para la estandarización del ELISA IgG anti-*Leishmania*, con tiempos de incubación del suero de 1 hora, conjugado 30 minutos y sustrato 30 minutos, en todos los casos a una temperatura de incubación de 37°C. Los resultados expresados en la tabla 10 y las gráficas 10 y 11, demuestran que la concentración de ASL que permite discriminar con un rango mayor de DO entre los sueros positivos y negativos empleados fue de 20 µg/ml, la dilución de los sueros control positivo y control negativo pre-tratado fue de 1/21 y la dilución del conjugado fue de 1/100. También se observa que a la dilución del suero de 1/10, se tienen DO menores que a 1/21, esto se puede atribuir al efecto de pro-zona+ que es muy típico en reacciones de aglutinación pero que también pueden darse en este caso⁽⁴³⁾, debido al exceso de anticuerpos, se forman complejos pequeños Ac-Ac con los anticuerpos unidos covalentemente a los antígenos de la placa y que son removidos durante la fase de lavado de los micropozos, disminuyendo de esta

manera la DO, este efecto se observó también en el análisis previo a la estandarización, en la fase de eliminación de interferencia por los anticuerpos IgG anti-*Leishmania* (tabla N°9).

Estas condiciones de trabajo encontradas son diferentes a las utilizadas por otros investigadores que realizaron un pre-tratamiento de los sueros. En estudios realizados por M.L.B. Souza y colaboradores, AM Atta para la determinación de anticuerpos IgE anti-*Leishmania* se utilizó una concentración de 0,5 µg/ml de ASL, una dilución del suero de 1/6 y 1/2 respectivamente y una dilución del conjugado de 1/500 y 1/100 respectivamente. En ambos casos se utilizó un tiempo de incubación del suero de 18 horas a 4°C y para el conjugado un tiempo de 1 hora a 37°C en el caso de M.L.B. Souza y 30 minutos a temperatura ambiente en el caso de AM Atta. En estos estudios se observa que las desviaciones estándar encontradas (M(+) DS= 0,026 y 0,030 respectivamente) son mayores a las encontradas en nuestro estudio (M(+) DS = 0,018; M(-) DS = 0,005). Estas desviaciones estándar son menores a las encontradas en la estandarización del ELISA IgG (M(+) DS = 0,240; M(-) DS = 0,013). Estos investigadores demostraron que la determinación de anticuerpos tipo IgE resultó ser más sensible y específica para el diagnóstico y seguimiento serológico de esta enfermedad.

e. Determinación de las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados.

i. Determinación de la línea de corte con muestras negativas para el ELISA IgG anti-*Leishmania*

Para la determinación de la línea de corte del ELISA estandarizado tipo IgG anti-*Leishmania* se procesaron 50 muestras negativas (método utilizado en experiencias anteriores de estandarización de ELISAs) encontrando un valor promedio de 0,203 ($p < 0,05$) y una desviación estándar de 0,019, al sumar 3 veces la desviación estándar ($3DS = 0,057$) al promedio se determinó el valor de la línea

de corte era de 0,260, esta forma de determinar la línea de corte fue también utilizada por M.L.B. Souza y colaboradores, V. Iniesta y M.A. de Sousa , pero no se muestra el valor de esta en ninguno de los casos. De la misma forma se procedió al utilizar 10 muestras negativas y 15 positivas utilizadas como control de calidad de la prueba (método utilizado en experiencias anteriores de estandarización de ELISAs) encontrando en este caso un valor de línea de corte igual a 0,276. Se utilizaron estos dos procedimientos para encontrar la línea de corte simplemente con fines de comparación y se puede observar que no hay diferencia significativa entre los dos procedimientos utilizados, en ambos casos los valores de línea de corte no sobrepasaron los valores del umbral de negatividad de 0,300 tomados como referencia del kit comercial, cuyo valor de línea de corte no tiene un valor fijo y se calcula para cada uno de los análisis que se realizan, sumando un valor de 0,150 al promedio de DO del suero control negativo. Estos valores nos permitieron discriminar entre los valores de DO de muestras positivas y muestras negativas presentadas en la gráfica 13 en donde la DO menor de todos los sueros positivos es $DO = 0,538$ y la mayor es $DO = 0,838$ estos valores son similares a los encontrados en el estudio de AM Atta que encontró un rango de positividad de DO desde 0,554 hasta 1,266.

ii. Determinación de la línea de corte con muestras negativas para el ELISA IgE anti-*Leishmania*

Para la determinación de la línea de corte del ELISA IgE *anti-Leishmania* estandarizado se procedió de la misma forma que para el ELISA IgG *anti-Leishmania*, se procesaron 50 muestras negativas, encontrando un valor promedio de 0,114 ($p < 0,05$) y una desviación estándar de 0,017 al sumar 3 veces la desviación estándar ($3DS = 0,051$) al valor promedio se encontró el valor de la línea de corte que fue de 0,155. De la misma forma, se procedió al utilizar 10 muestras negativas y 15 positivas utilizadas como control de calidad de la prueba, encontrando en este caso un valor de línea de corte igual a 0,173, en ambos casos se utilizaron los sueros que se utilizaron para determinar la línea de corte del ELISA IgG *anti-Leishmania* realizándoles el tratamiento previo con PEG al 12,5% en la

gráfica 15 se puede observar una buena discriminación entre los valores de DO de muestras positivas y muestras negativas teniendo un valor mínimo de DO de suero positivo $DO= 0,215$ y un valor máximo $DO= 0,550$. En la determinación de anticuerpos IgE realizado por AM Atta, se encontraron valores promedio de los sueros positivos analizados igual a $DO=0,108$ y de $DO=0,104$ en el estudio realizado por M.L.B. Souza y colaboradores, 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. En nuestro estudio por la falta de un kit comercial de referencia que mida anticuerpos IgE, no pudimos realizar estudios de correlación de nuestros resultados para determinar la sensibilidad y especificidad de la nueva prueba estandarizada, para salvar esta carencia se debe realizar un test diagnóstico con pacientes con y sin la enfermedad debidamente caracterizados por criterios clínicos y de laboratorio.

f. Determinación de la repetitividad de los resultados del estudio

Para poder determinar el grado de repetitividad se eligieron dos sueros control, uno positivo y uno negativo elegidos al azar de entre todos los sueros utilizados para la estandarización del ELISA IgG anti-*Leishmania*, al realizar cada uno de los cinco análisis a diferentes tiempos pero bajo las mismas condiciones de trabajo estandarizados, pudimos observar que existía buena repetitividad tanto en el del suero control positivo como en el suero control negativo, presentándose una diferencia promedio máxima entre todos los análisis del suero control positivo de 0,018 unidades de DO y una diferencia promedio máxima entre todos los análisis del suero control negativo de 0,008.

g. Determinación de la correlación de resultados del ELISA IgG estandarizado frente a otro método de ELISA comercial.

Para la determinación del grado de correlación de resultados del ELISA indirecto estandarizado frente al comercial se utilizaron 15 muestras positivas (diferentes a

las utilizadas en la estandarización) y 10 negativas (elegidas al azar de entre las 50 negativas utilizadas en la estandarización). Se utilizó este número de muestras en base a la disponibilidad del kit comercial ELISA r-Biopharm® utilizado como referencia en el estudio de comparación.

Al procesar estas muestras con las condiciones de trabajo tanto del ELISA estandarizado con tiempos de incubación del suero de 1 hora a 37°C, del conjugado 30 minutos a 37°C y del sustrato 30 minutos a 37°C; como del ELISA comercial r-Biopharm® tomado como referencia con tiempos de incubación de 15 minutos para el suero, el conjugado y el sustrato todo a temperatura ambiente (18-25°C) se pudo observar 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 (tabla 12).

En la tabla 12, se observa que existe un 100% de correlación de resultados positivos con una sensibilidad igual al 100% y 100% de correlación entre los resultados negativos $E=100\%$ entre los métodos evaluados, encontrando un índice de correlación de *Kappa* de 1 ($p < 0,05$) lo que equivale a una muy buena correlación de resultados entre los dos métodos en estudio.

En los estudios realizados por M.L.B. Souza y colaboradores y A.M. Atta, encontraron que la sensibilidad y especificidad de sus métodos fue del 100% pero, en ninguno de los casos se muestran los métodos estadísticos para realizar estos cálculos.

Al no tener datos de estudios anteriores para la estandarización de ELISAs IgE anti-*Leishmania* ni tampoco un kit comercial de referencia que evalúe anticuerpos de tipo IgE (que no existe en nuestro medio) nos fue imposible realizar una correlación de nuestros resultados obtenidos con el ELISA que estandarizamos

h. Costos del kit casero

Otro aspecto que fue objeto de análisis en el presente trabajo, fue el análisis de costos de los dos ELISAs estandarizados frente al costo del kit comercial de ELISA. Se determinó que el costo de la prueba por paciente del ELISA IgG anti-*Leishmania* es de 15,77 bolivianos, para el de tipo IgE anti-*Leishmania* es de 28,58 bolivianos. El costo de prueba por paciente del Kit comercial resultó ser de 79,16 bolivianos. Con este análisis se demuestra que, el apoyo y seguimiento de la enfermedad, utilizando los kits estandarizados como herramienta diagnóstica, resultaría ser en promedio un tercio más barato que si se lo hiciera utilizando un kit de ELISA comercial. Esto a su vez implicaría que esta prueba sea más accesible para los pacientes si consideramos que la leishmaniasis es una enfermedad que afecta principalmente a los sectores empobrecidos de la sociedad.

XIII. CONCLUSIONES

Producto de las pruebas realizadas en el presente trabajo de tesis se logró estandarizar dos pruebas de ELISA de tipo indirecto para determinar anticuerpos IgG e IgE anti-*Leishmania* como marcadores de diagnóstico de la enfermedad.

La estandarización del cultivo continuo de los promastigotes de *Leishmania braziliensis* determinó que se debe realizar el cambio de medio de cultivo o ~~pas~~ después de las 72 horas de cultivo a 26°C, reemplazando todo el medio ~~an~~ por uno ~~nu~~ nuevo y fresco, trabajando siempre bajo la protección de la campana de flujo y verificando antes de cada pase que no exista contaminación en las cajas de cultivo. De esta manera se logró tener viables a los promastigotes durante un lapso de aproximadamente 6 meses sin presentarse cambios en la morfología del parásito.

Se determinó que para tapizar las microplacas de ELISA se deben trabajar con concentraciones de 180 a 235 µg/ml de promastigotes a partir de los cuales se obtiene el antígeno soluble de *Leishmania*, con el que se deben tapizar las microplacas a una concentración de 10 µg/ml en el caso del ELISA tipo IgG anti-*Leishmania* y de 20 µg/ml en el caso del ELISA IgE anti-*Leishmania* para determinar los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes.

Para determinar las concentraciones óptimas del conjugado anti-gammaglobulina humana para la determinación de anticuerpos de tipo IgG e IgE por ELISA indirecto se encontró que, para el ELISA tipo IgG se debe trabajar con la dilución de 1/500 y para el ELISA tipo IgE se debe trabajar con la dilución 1/100; estas condiciones permiten obtener buena diferenciación entre los sueros positivos y negativos en cuanto a los niveles de densidad óptica se refiere.

Mediante las pruebas realizadas para encontrar las líneas de corte de los dos ELISAs estandarizados, se determinó que se puede trabajar con uno u otro método empleado en este estudio, ya que no se encuentran diferencias significativas entre los valores de densidad óptica, tanto en el ELISA IgG como en el ELISA IgE. Teniendo como valor cut-off para el ELISA IgG igual a 0,276 como valor máximo encontrado y de 0,173 en el caso del ELISA IgE.

El grado de correlación de los resultados de la prueba de ELISA estandarizada frente a los resultados emitidos por el ELISA comercial r-biopharm® para la determinación de anticuerpos IgG anti-*Leishmania*, se encontró que existe un 100% de correlación de resultados positivos, con una sensibilidad igual al 100% y 100% de correlación entre los resultados negativos especificidad E=100% entre los dos métodos evaluados; también, se encontró un índice de correlación de *Kappa* de 1 ($p < 0,05$) que equivale a una muy buena correlación de resultados entre los métodos en estudio. En el caso del ELISA IgE, se encontró un 100% de correlación de resultados de densidad óptica de sueros positivos y sueros negativos (*Kappa*=1).

XIV. RECOMENDACIONES

Los ensayos inmunoenzimáticos ligados a enzimas (ELISA) son utilizados para el diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades tanto inmunes como parasitarias, que dependiendo del antígeno utilizado, presentan mayor sensibilidad y especificidad en comparación con otras técnicas de diagnóstico, en nuestro caso si bien las estandarizaciones de las técnicas ELISA tipo IgG e IgE fueron realizadas en base a estudios anteriores enfocadas en la leishmaniasis visceral, pudimos evidenciar que la detección de anticuerpos IgE anti-*Leishmania* realizadas en la población estudiada puede ser considerada como un método complementario para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea. Los resultados de nuestro estudio indican que la detección de anticuerpos IgE anti-*Leishmania* puede usarse como marcador sensible y específico para detectar la enfermedad activa, pero es necesario continuar el estudio bajo la metodología de casos y controles para determinar si los niveles de este tipo de anticuerpos permanecen constantes o disminuyen después de seguir un tratamiento leishmanicida, ya que un nivel constante de IgE e IgG después del tratamiento sin éxito puede estar correlacionada con la persistencia de la enfermedad y evidenciarse en una recaída clínica y la resolución de la infección correspondería a una disminución significativa de los niveles de IgE e IgG, tal como se refleja en la patogénesis de la leishmaniasis visceral y su regulación en el control de la enfermedad.

Además esta técnica de ELISA puede constituirse en una alternativa de menor costo que se puede efectuar fácilmente y obtener resultados rápidos. Sin embargo se necesita realizar otros estudios para confirmar la validez de esta prueba utilizando una población mayor y realizando la medición de estos tipos de anticuerpos antes, durante y después de que el paciente reciba el tratamiento contra la enfermedad.

XV. BIBLIOGRAFIA

1. S.L. Ibañez, G. Ruiz, R. de Michel, M. Sauvain. Evaluación De La Flora En El Valle De Zongo Contra Leishmania y Chagas. Rev. Bol. De Química 2008; 25:1.
2. J. Ampuero, M. Urdaneta, V. de Oliveira. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro 2005; 21: 161-170.
3. S. R. Iñiguez, Leishmaniosis visceral en el Criceto Dorado: Valoración de nuevas formulaciones de Anfotericina B 2004 .
4. Ministerio de Salud y Deportes. Leishmaniasis, Guía operativa para el control en Bolivia. Unidad de Epidemiología, Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis Comité de Identidad Institucional. 2007.
5. H. H. Henao, Y. Osorio, N. G. Saravia, A. Gómez, B. Travi. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. Biomédica 2004;24:393-402.
6. B. Martínez-Salazar, M. Berzunza-Cruz, I. Becker. El ADN de *Leishmania mexicana* activa al macrófago murino e induce aumento en la expresión de TLR9 Gac. Méd. Méx. 2008;144:2.
7. A. Pumarola, A. Rodriguez-Torres, J. A. Garcia-Rodriguez ,G. Piedrola-Angulo Microbiología y Parasitología Medica, 2ª ed, Ed. Salvat, 820 . 824.
8. R. Reithinger, J.C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander, S. Brooker; Cutaneous leishmaniasis; Lancet Infect Dis. September 2007; 7:581. 96
9. S. Mollinedo, M. Torrez, E. Holguin, F. Vargas, Leishmaniasis en Bolivia: Epidemiologia de fin de siglo, Rev. Medica. Octubre-Diciembre 2000; 7:1.
10. Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis Actualización 2007, disponible en: <http://www.ops-oms.org/> revisado en marzo 2010.
11. C. Vidyashankar, G.J. Noel. Leishmaniasis. Medicine Journal 2002; 3:1-19
12. OPS. Resumen del Análisis de Situación y Tendencias De Salud . Bolivia, Noviembre-2004.
13. Ministerio de Salud y Deportes, Leishmaniasis Guía operativa para el control en Bolivia. 2007;1

14. Organización Panamericana de la Salud, Epidemiología y Control De La Leishmaniasis en las Américas, por País o Territorio, 1996.
15. J. Hernández-Ruiz, I. Becker. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea, Salud Pública De México. Septiembre-Octubre 2006; 48:5.
16. M. Padron, E. Diaz, A. Romero, C. Machuca, A. Ponte. 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.
17. G. Cáceres-Dittmar, F.J. Tapia. Inmunopatología de la lesión cutánea en la Leishmaniasis Cutanea Americana; Dermatología Venezolana 1993;31:2.
18. J. H. Ruiz, I. Becker, CD 8 Cytotoxic T cells in Cutaneous Leishmaniasis, Parasite immunology 2007; 29: 671. 678
19. S. Agudelo, S. M. Robledo. Respuesta Inmune en Infecciones Humanas por Leishmania spp. Latreia, Septiembre 2000;13:3.
20. B. Beutler, A. Cerami. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. Ann Rev Biochem 1988; 57: 505- 518.
21. Y. Montoya, C. Padilla, O. Nolasco, C. León, M. Talledo, J. Choque, O. Cáceres , T. Barreto, M. De Los Santos, I. Campos, S. Douglas, C. Yabar y D. Barker. Diagnóstico Molecular Para Leishmaniasis, Rev Med Exp 1997;14:1.
22. R. Oddone, A. Canese, J.D. Maciel, G.R. Velázquez, T. Meza, M.G. Mendoza de Sánchez. Leishmaniasis tegumentaria: sensibilidad de la inmunofluorescencia indirecta en pacientes con diagnóstico parasitológico, Mem. Inst. Invest. Cienc. Salud , Asunción 2005;3:1.
23. E. McFarlane, C.Perez, M. Charmoy, C. Allenbach, K. C. Carter, J. Alexander, F. Tacchini-Cottier. Neutrophils Contribute to Development of a Protective Immune Response during Onset of Infection with *Leishmania donovani*. Infection and Immunity, Feb. 2008; 532. 540.
24. A. Da-Cruz, M. Pereira de Oliveira, P. Mello De Luca, S. CF. Mendonca, S. G. Coutinho, Tumor Necrosis Factor-alpha in Human American Tegumentary Leishmaniasis, Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Mar-Apr. 1996;91:1.

25. E. Kouris, A. Calebotta, F. González. Eosinófilos: su rol en la patología dermatológica severa, *Dermatología Venezolana* 2005;43:2.
26. N. H. Isabel. Eosinofilia y parasitosis. . *Rev. chil. pediatr.* sept. 1999;70:435-440.
27. M.S. Parreira de Arruda, M.E. Nogueira, A.P. Bordon, Histological evaluation of the lesion induced by inoculation of *Leishmania Mexicana* in the cheek pouch of the hamster, *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35:293-7.
28. M. Gállego, C. Riera. Las Leishmaniosis Humanas: Leishmaniosis Autóctona por *Leishmania infantum*, Unitat de Parasitologia, Departament de Microbiologia y Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona.
29. S. Mollinedo. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el diagnostico de Leishmaniasis, Unidad de Parasitología y Entomología INLASA La Paz 2002;1.
30. L. Iniesta. Diagnostico de la leishmaniosis criptica en el perro. Expresión isotípica e idiotípica de los anticuerpos producidos en distintas fases de la infección, Departamento de microbiología y parasitología, Universidad de Barcelona 2007.
31. K. Anam, F.Afrin, D. Banerjee, N. Pramanik, S. K. Guha, R. P. Goswami, S. K. Saha, N. Ali. 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, Dec. 1999; 67:12 6663. 6669.
32. AM Atta, D'Oliveira, J Correa, ML Atta, RP Almeida, and EM Carvalho Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998;59:3 426-430.
33. M.L.B. Souza-Atta, M.I. Araújo, A. D'Oliveira Júnior, A. Ribeiro-de-Jesus, R.P. Almeida, A.M. Atta, E.M. Carvalho. Detection of specific IgE antibodies in parasite diseases, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999;32: 1101-1105
34. J. Dias Costa, M.N. Meirelles, C. E. Pereira Velloso, R. Porrozzi *Leishmania chagasi*: Cytotoxic effect of infected macrophages on parenchymal liver cells, *Experimental Parasitology* Dec, 2007;117: 4 390-398.

35. I. Vouldoukis, F. Issaly, C. Fourcade, N. Paul-Eugène, M. Arock, J.P. Kolb, O. Alves da Silva, L. Monjou, H. Poinot, Y. Tselentis, B. Dugas, P. Debré and M.D. Mossalay, CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis : Possible role in monocyte activation, *Research in Immunology* 1994; 145:1 17-27.
36. M. D. Mossalayi, M. Arock, D. Mazier, P. Vincendeau and I. Vouldoukis, The Human Immune Response during Cutaneous Leishmaniasis: NO Problem *Parasitology Today* Aug. 1999;15:8 342-345.
37. E. Bensoussan, A. Nasereddin, F. Jonas, L. Schnur, C. Jaffe. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinica Microbiology* 2006;44:4 1435 . 1439.
38. O. Zerpa, R. Borges, N. Loyo, W. Galindo, D. Belisario, N. Rodríguez, A. Sosa, J. Convit; Comparación de cinco métodos para el diagnostico de leishmaniasis cutánea *Dermatologia Venezolana*, 2002; 40:4.
39. A.M Atta, M.L.B. Sousa-Atta, A. D'Oliveira, R.P. Almeida, M.I. Araújo, E.M. Carvalho. IgG Anti-IgE Autoantibodies in Visceral Leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. January 2002;97:1 101-103.
40. Indices de concordancia, disp: http://www.hrc.es/bioest/errores_2.html#tabla_lan
41. Corning Incorporated, Effective Blocking Procedures ELISA Technical Bulletin - No. 3. 2001 disponible en: www.corning.com/lifesciences, revisado en marzo 2010
42. R. Pearce, P. and B. Roser. Comparison of Blocking Agents for ELISA. Cambridge Research Laboratories, England. Technical Bulletin 2007.
43. Técnicas inmunológicas, *Inmunología* 2009;10 disponible en: www.ucm.es/info/saniani, revisado en marzo 2010.

ANEXOS



ANEXO 1. Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M, pH 7.4 NaCl 0,15 M.

Se preparo una solución stock de tampón PBS salino al 10X, para ello se pesó:

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (SIGMA)	2,5 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (MP-Biomedicals)	22,4g
NaCl (SIGMA)	87,6g
H ₂ O csp.	1000 ml

Una vez diluido y aforado en un matraz se ajusto el pH, se mando a autoclavar y se guardó a 4 °C hasta su utilización para lo cual se diluyó al 1X

ANEXO 2. Tampón Carbonato Æ bicarbonato 0,1 M pH 9,6

Se preparo una solución stock de tampón Carbonatos al 1X para ello se pesó:

Na ₂ CO ₃ (SIGMA)	3,2 g
NaHCO ₃ (SIGMA)	5,9 g
H ₂ O csp.	1000 ml

Una vez diluido y aforado en un matraz se ajusto el pH, se mando a autoclavar y se guardó a 4 °C hasta su utilización.

ANEXO 3. Solución de lavado PBS Æ Tween 20 al 0,05 %

Se preparó una solución de PBS . Tween 20 al 0,05 % al 1X para ello se empleo:

Tween 20 (SIGMA)	0,5 ml
PBS pH 7,4 csp.	1000 ml

Una vez diluido el Tween 20 se guardo la solución a 4°C

ANEXO 4. Diluyente de sueros y conjugado PBS Æ Tween 20 al 0,05 % BSA 0,1%

Se preparó una solución diluyente al 1X para ello se utilizó:

BSA (fracción V - SIGMA)	0,1 g
PBS . Tween 20 al 0,05 % csp.	100 ml

Una vez diluido el BSA se guardo la solución a 4°C.

ANEXO 5. Solución de bloqueo PBS Æ BSA 0,1%

Se preparó una solución de bloqueo PBS . BSA 0,1% al 1X para ello se utilizó:

BSA (Fracción V - SIGMA)	0,1 g
PBS pH 7,4 csp.	100 ml

Una vez diluido el BSA se guardó la solución a 4°C.

ANEXO 6. Tampón citrato Æ fosfato pH 5

Se preparó una solución stock de tampón Citrato al 1X que se utiliza para la disolución del sustrato OPD para ello se pesó:

C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O (SIGMA)	2,92 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (MP Biomedicals)	7,39 g
H ₂ O csp.	500 ml

Una vez diluido y aforado en un matraz se ajustó el pH, se mandó a autoclavar y se guardó a 4 °C hasta su utilización.

ANEXO 7. Sustrato ortofenildiamina (OPD)

Se preparó una solución de sustrato OPD 10 minutos antes de su utilización para ello se pesó 22 mg de OPD (SIGMA) que se diluyeron en 10 ml de tampón Citrato y en el momento de su uso se añadió 18 µl de H₂O₂ manteniendo la solución en oscuridad.

ANEXO 8. Polietilenglicol (PEG) al 12,5% (SIGMA)

Se preparó una solución de PEG al 12,5 % para precipitar los complejos inmunes formados a partir del IgG presente en suero del paciente y el Ac anti-IgG humano.

Polietilenglicol (SIGMA)	6,25 g
Solución salina fisiológica csp.	50 ml

Una vez diluido el PEG se guardó la solución a 4°C hasta su utilización.

ANEXO 9. Protocolo de trabajo del método de Lowry

Reactivos

Sol. A Carbonato de sodio 2% hidróxido de sodio 0.1 N

Sol. B Tartrato de sodio y potasio 2%

Sol. C Sulfato de cobre 1%

Sol. D Folan 1N

Sol. E De trabajo 200ml de sol. A + 2ml de sol. B + 2ml de sol. C.

Procedimiento

- Preparar solución stock de BSA (5mg/10ml).
- Preparar las soluciones estándar para la curva patrón.
- Marcar tubos de ensayo de la A a la G, los tubos para las muestras a analizar (trabajar por duplicado) y el blanco reactivo.
- Al tubo blanco reactivo añadir 200 μ l de H₂O destilada (d).
- En los tubos marcados añadir 200 μ l de las soluciones estándar y las muestras a analizar donde corresponda.
- Añadir 3ml de solución de trabajo (sol. E) agitar en vórtex y dejar reposar 10 minutos.
- Añadir 300 μ l de sol. D
- Mezclar suavemente y dejar reaccionar por 30 minutos en oscuridad
- Leer las absorbancias a 750nm
- Con los promedios graficar la curva patrón e interpolar las absorbancias de las muestras a analizar

	μ g/ml	BSA	H ₂ O d
A	25	50	950
B	50	100	900
C	100	200	800
D	150	300	700
E	200	400	600
F	250	500	500
G	300	600	400

ANEXO 10. Cálculo de la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y concordancia de la técnica ELISA estandarizada frente al ELISA comercial Ridascreen Ë Biopharm®

		PRUEBA DE REFERENCIA		
		POSITIVOS (+)	NEGATIVOS (-)	TOTAL
RESULTADO DE LA PRUEBA	POSITIVOS (+)	VERDADEROS POSITIVOS (VP)	FALSOS POSITIVOS (FP)	VP + FP
	NEGATIVOS (-)	FALSOS NEGATIVOS (FN)	VERDADEROS NEGATIVOS (VN)	FN + VN
TOTAL		VP + FN	FP + VN	TOTAL

$$\text{SENSIBILIDAD} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO POSITIVO} = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

$$\text{ESPECIFICIDAD} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO NEGATIVO} = \frac{VN}{VN + FN} \times 100$$

$$K = \frac{po - pe}{1 - pe}$$

$$po = \frac{VP + VN}{n}$$

$$pe = \frac{CP + CN}{n}$$

INTERPRETACION		
	CONCORDANCIA	KAPPA
1	DEFICIENTE	<0,20
2	REGULAR	0,21-0,40
3	MODERADA	0,41-0,60
4	BUENA	0,61-,080
5	MUY BUENA	0,81-1,00

$$CP = \left| \left(\frac{VP + FP}{N} \right) \times \left(\frac{VP + FN}{n} \right) \right| \times n$$

$$CN = \left(\frac{FN + VN}{n} \right) \left| \left(\frac{VP + FN}{n} \right) - CP \right|$$

$$CP = \left| \left(\frac{15 + 0}{25} \right) \times \left(\frac{15 + 0}{25} \right) \right| \times 25$$

$$CP = \left| \left(0,6 \right) \times \left(0,6 \right) \right| \times 25$$

$$CP = 9$$

$$CN = (0 + 10 - | (15 + 0) - 9 |)$$

$$CN = (10 - | (15) - 9 |)$$

$$CN = 10 - 6$$

$$CN = 4$$

$$p_o = \frac{15 + 10}{25}$$

$$p_o = \frac{25}{25}$$

$$p_o = 1$$

$$p_e = \frac{9 + 4}{25}$$

$$p_e = \frac{13}{25}$$

$$p_e = 0,52$$

$$K = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

$$K = \frac{1 - 0,52}{1 - 0,52}$$

$$K = \frac{0,48}{0,48}$$

$$K = 1$$

