



IV Jornadas de Comunicaciones de la Facultad de
Ciencias Naturales
II Jornadas de Enseñanza de las Ciencias
Naturales de Salta
12 y 13 de Noviembre de 2009



COMPARACIÓN DE PRUEBAS DE ELISA, CON DIFERENTES ANTÍGENOS DE *Leishmania*,
MEDIANTE CURVAS ROC Y EL ÍNDICE KAPPA

^{1,2} Hoyos Carlos L., ^{1,2} Rubén O Cimino, ^{1,2,3} José F Gil, ¹ Inés López Quiroga, ² Silvana P Cajal, ² Norma Acosta, ² Marisa Juárez, ^{3,4} María F García Bustos, ^{1,2} Julio R Nasser.

¹ Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Naturales. UNSa. Av. Bolivia N°: 5150. CP: 4400. Salta. ² Instituto de Investigación de Enfermedades Tropicales. UNSa. ³ CONICET. ⁴ Instituto de Patología Experimental. krlosh@gmail.com.

La Leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoos flagelados del género *Leishmania* que, dependiendo de la especie infectante, pueden generar la Leishmaniasis Tegumentaria (LT) o la Leishmaniasis Visceral. La LT se manifiesta mediante varias formas clínicas las que pueden incluir lesiones cutáneas locales (LC) o múltiples, mucocutáneas (LMC) o anérgicas como la difusa (LCD). En el norte de la provincia de Salta se observó LC (93 %) múltiple y/o simple y LMC (7%). Se ha empleado para diagnóstico de LTA signos clínicos (lesiones), histopatología, detección de parásito en lesión, estos métodos presentan limitaciones. Los homogenados proteicos en Ensayos Inmunoenzimáticos (EI), ha mostrado resultados prometedores como herramienta de apoyo para la diagnosis y potencial método de screening, son rápidos y de bajo costo. Nuestro objetivo fue comparar, mediante curvas ROC y el índice kappa, tres pruebas de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) que utilizan como antígenos, homogenados proteicos de *L. (V.) braziliensis* (Eb), *L. (L.) amazonensis* (Ea) y *L. (V.) guyanensis* (Eg) en la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en pacientes del norte de Salta. Se analizó un total de 48 sueros humanos: 34 sueros con infección leishmaniásica demostrada por IRM y frotis (LC n=26; MCL n=8); 14 sueros con infecciones mixtas *Leishmania sp-Trypanosoma cruzi* (IM); IRM y frotis para el caso de *Leishmania* y PCR y/ELISA recombinante para Chagas (Wiener Lab); 27 sueros de pacientes sanos (CN) de la capital provincial como controles negativos y 10 sueros de pacientes chagásicos (CH), confirmados por ELISA recombinante, HAI Wiener y/o ELISA-HPTUL. En la técnica de ELISA se utilizó 2µg/pocillo de antígeno; dilución de suero 1:40, anti IgG marcada con peroxidasa dilución 1:10.000. La reacción fue revelada con Ortofenildiamina en presencia del sustrato específico (H₂O₂) y se detuvo con H₂SO₄ (2N). Las lecturas de densidad óptica (DO) se realizaron en un lector Biotek ELx800 a 490 nm. Los resultados de reactividad de las ELISAs fueron comparados mediante curvas ROC (Received-Operator Curve). Se calculó valores de cut off, Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos Positivos (VPP) y Negativos (VPN), asumiendo un 5% de prevalencia. Además se evaluó la concordancia de las tres pruebas utilizando el Índice kappa. El software utilizado fue el Epidat 3.1. Se comparó los distintos grupos de muestras mediante intervalos de confianza, con metodología no paramétrica bootstrap (Infostat). Las DO en general mostraron bajos niveles para los sueros CN mientras que las de los sueros LC presentaron títulos elevados frente a Eb (media =1.062 DS=±0.101), Ea (media=0.888; DS=±0.099) y Eg (media =1.084; DS=±0.117), aunque con marcada dispersión. Al comparar las medias de DO de CL, para Eb, Ea y Eg, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p>0,05). La S y E fue del 86,67% y 93,33% para Eb y Ea, mientras que para Eg fue de 93,33% y 100%, obteniendo valores de cut off de 0,36 DO, 0,30 y 0,30 para Eb, Ea y Eg, respectivamente. Las áreas ROC obtenidas no mostraron diferencias significativas (p=0,115). A pesar de que Eg mostró mas altos VPP y VPN. El índice kappa fue de 0,798 y reveló una importante concordancia. Por otra parte tanto el grupo de LMC, CL, CH e IM mostraron niveles elevados de IgG y no hubo diferencias entre ambos (p>0,05). Es común encontrar elevados porcentajes de cruza de reacción cuando se estudian pacientes CH en este tipo de pruebas independientemente del antígeno utilizado. La prueba de ELISA podría ser usada como herramienta de apoyo diagnóstico, con cualquiera de los tres homogenados evaluados, en áreas donde la endemidad de la LTA y el Chagas no estén solapadas o la prevalencia de esta última sea muy baja. Deberían usarse pruebas específicas confirmatorias luego de un resultado positivo (pruebas secuenciales) o, combinar ELISA con otros métodos diagnósticos para mejorar la sensibilidad global (pruebas paralelas). Los valores predictivos de las tres ELISAs fueron de 25,5%, 42,4% y 98% para Eb, Ea y Eg respectivamente. Así, el elevado valor predictivo positivo de Eg encontrado nos brinda posibilidades estudios de seroprevalencia y factores de riesgo con una elevada verosimilitud.

Palabras clave: Leishmaniasis, ELISA, Serología, Diagnóstico.