

Evaluación del antígeno recombinante K39 para el serodiagnóstico de leishmaniasis visceral mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Doménica Cannova, Raiza Cañate, Ligdina Castillo, Marcos Cruces, Gracy Zambrano, María Isabel Simons.



RESUMEN

La leishmaniasis visceral (LV) es una protozoosis causada por parásitos del complejo *Leishmania donovani*, caracterizada clínicamente por síndrome febril prolongado, hepatoesplenomegalia, anemia y pérdida progresiva de peso, que puede ser mortal especialmente en niños si no es diagnosticada precozmente. Entre los métodos serológicos más utilizados para el diagnóstico de LV se encuentra el ensayo inmunoenzimático (ELISA). En la actualidad se caracterizan antígenos que aumentan la especificidad de las pruebas serológicas, esto se ha logrado con la utilización de antígenos recombinantes como el K39 (rK39). Este estudio evaluó el antígeno rK39 mediante ELISA, para el serodiagnóstico de leishmaniasis visceral. Se utilizaron 100 sueros caracterizados positivos para LV, que presentaron al menos tres de los siguientes criterios diagnósticos: clínica, epidemiología, serología y demostración directa del parásito (extendido de médula ósea). Los controles incluyen 100 sueros caracterizados negativos para LV y 30 positivos a otras patologías: tuberculosis (5), tripanosomiasis (5), toxoplasmosis (5), lepra (5), leishmaniasis cutánea (5), malaria (2) y HIV/SIDA (3). El rK39 obtuvo una sensibilidad de 92% y una especificidad de 100%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo 92,6%, así mismo, no se observaron reacciones cruzadas con sueros de otras patologías. Al lograr estandarizar y evaluar el antígeno rK39 empleando ELISA, se concluye que es sensible y específico para el serodiagnóstico de la LV. Al incorporarlo en el protocolo de diagnóstico del Laboratorio de Leishmaniasis del Departamento de Parasitología contribuirá a mejorar el diagnóstico de esta parasitosis, beneficiando así a pacientes del Estado, Carabobo y su área de influencia.

Palabras Clave: Leishmaniasis visceral, antígeno recombinante K39, ELISA, serodiagnóstico.

Laboratorio de Leishmaniasis y Entomología.
Departamento de Parasitología, Valencia, Estado Carabobo.
Escuela de Medicina. Facultad de Ciencias de la Salud.
Universidad de Carabobo. Venezuela.

Correspondencia: D.C. Cannova

E-mail: dcannova@uc.edu.ve o dcannova@gmail.com
Tel.: 0241-8675017- 04144288922.

Financiado por CDCH-UC # 2333-2004.

Recibido: Febrero 2007 **Aceptado:** Julio 2007

ABSTRACT

Evaluation of recombinant K39 antigen for the serological diagnosis of visceral leishmaniasis with enzyme linked immuno-absorbent assay (ELISA).

Visceral leishmaniasis (VL) is a protozoa disease caused by parasites of the *leishmania donovani* complex, whose clinical symptoms include prolonged fever, hepatomegaly, splenomegaly, anemia and gradual weight loss, and could be life threatening, especially in children, if not diagnosed early. Between most serological tests used for diagnosing VL is the enzyme linked immuno-absorbent assay (ELISA). At the present time antigens increase the specificity of serological tests, which has been achieved by the use of recombinant antigens, such as recombinant K39 antigen (rK39). In this study rK39 antigen was assessed, using ELISA for the serological diagnosis of visceral leishmaniasis. 100 confirmed positive serum samples for VL were used, having any three of the following criteria: clinical signs, epidemiology, serological confirmation or demonstration of parasite (bone marrow aspiration). Controls were 100 confirmed negative serum samples for VL and 30 sera infected with other pathologies: tuberculosis (5), trypanosomiasis (5), toxoplasmosis (5), leprosy (5), cutaneous leishmaniasis (5), malaria (2), HIV/AIDS (3). The rK39 ELISA obtained a sensitivity of 92% and a specificity of 100%. The positive predicted value was 100% and the negative predicted value was 92.56%. No cross reaction was observed with the sera infected with other pathologies. The rK39 ELISA has a high sensitivity and specificity for the serological diagnosis of VL, and the use of this test for the VL diagnostic protocol is recommended.

Key words: visceral leishmaniasis, recombinant K39 antigen, ELISA, serological diagnosis

INTRODUCCION

La leishmaniasis visceral (LV) o kala-azar es una protozoosis metaxénica causada por parásitos del género *Leishmania*. Es una infección de distribución mundial, endémica en 88 países tropicales y subtropicales con una incidencia anual estimada de 500.000 casos (1). En América, la prevalencia es mayor en Brasil, Argentina y Venezuela; aunque se ha reportado en Paraguay, Bolivia, Perú, El Salvador, Honduras, Guatemala y México. Venezuela es el segundo país con focos endémicos importantes en América después de Brasil (2).

La enfermedad se caracteriza por un síndrome febril prolongado, hepatoesplenomegalia, anemia y pérdida progresiva de peso. En América afecta principalmente a niños menores de 5 años y adultos jóvenes, pudiendo causar graves

complicaciones y la muerte en casos no diagnosticados ni tratados precozmente (3), por lo que es necesario contar con procedimientos confiables para su diagnóstico precoz y en consecuencia la aplicación de tratamiento adecuado que garantice la sobrevivencia del paciente. Uno de los métodos serológicos más utilizados en LV es ELISA, el cual es sensible y específico, en función del antígeno utilizado. Aunque la sensibilidad y especificidad de los antígenos crudos de promástigotas de *Leishmania chagasi*=*L. infantum* es buena, la alta reactividad cruzada con sueros de individuos con otras patologías como leishmaniasis tegumentaria, tripanosomiasis, tuberculosis y toxoplasmosis está presente (4,5,6).

Para incrementar la especificidad, antígenos recombinantes han sido utilizados en el serodiagnóstico de LV, como el recombinante K39 (rK39), el cual es una secuencia repetitiva de 39 aminoácidos, del carbono terminal de una proteína de la familia de las kinesinas de *Leishmania chagasi* (7). Este antígeno es sensible y específico para los anticuerpos de pacientes con LV causada por miembros del complejo *L. donovani*, sin reacciones cruzadas con otras patologías y además predice el establecimiento de la enfermedad en su fase aguda (6). Tal diferenciación entre LV aguda y asintomática no se observa con preparados crudos del parásito (7-11). El antígeno está siendo utilizado en muchos países tanto del viejo mundo como del nuevo mundo. En Venezuela, se utiliza rutinariamente ELISA rK39 en el Instituto de Biomedicina de la Universidad Central de Venezuela/Ministerio de Salud y Desarrollo Social, en Caracas, el cual es el organismo oficial que lleva a cabo el programa de control de la LV.

Sin embargo, en el Laboratorio de Leishmaniasis y Entomología del Departamento de Parasitología-Valencia (LLEDPV) de la Universidad de Carabobo, no se ha incorporado aún este recombinante en el diagnóstico serológico de esta enfermedad, a pesar de que a partir de 1992, se estandarizó el ELISA con antígeno crudo de *Leishmania chagasi*, siendo útil en el diagnóstico tanto individual como en estudios seroepidemiológicos (12). Pero dada la importancia de incorporar nuevos antígenos que mejoren los resultados de esta prueba inmunológica y que puedan minimizar los problemas de las reacciones cruzadas, en el LLEDPV nos planteamos evaluar el empleo de antígeno rK39 mediante ensayo inmunoenzimático para el serodiagnóstico de LV, para su inclusión dentro del protocolo de diagnóstico de LV.

MATERIALES Y METODOS

Sueros: Se utilizaron 250 sueros, divididos en cuatro grupos: **Grupo I:** 100 sueros caracterizados como positivos de leishmaniasis visceral, cumpliendo con al menos 3 de los criterios establecidos por la OMS (13): clínica, epidemiología, serología y diagnóstico parasitológico (extendido de médula ósea coloreada con Giemsa); constituyendo estos criterios la prueba de referencia. En este grupo se incluyen 77 sueros

de LV fueron donados por la Dra. Ulrich, del Instituto de Biomedicina-UCV, procedentes de diferentes áreas endémicas de Venezuela en su mayoría del Estado Nueva Esparta, el cual representa actualmente el foco más activo de LV en el país (14). El resto de los sueros provenían de pacientes de la consulta externa del Departamento de Parasitología-Valencia de la Universidad de Carabobo y diagnosticados en el Laboratorio de Leishmaniasis y Entomología, cumpliendo con los criterios antes mencionados.

Grupo II: Se utilizaron 100 sueros negativos para LV, de voluntarios sanos de regiones no endémicas, sin historia de infección, clínica o alguna otra enfermedad infecciosa asociada.

Grupo III: 30 sueros identificados con otras patologías: 5 de enfermedad de Chagas, 5 de toxoplasmosis, 5 de leishmaniasis cutánea, 2 de malaria, 5 de tuberculosis, 5 de lepra y 3 de VIH/SIDA. Estos sueros fueron usados para comprobar la existencia o no de reacciones cruzadas con el antígeno rK39.

Grupo IV: 20 sueros de voluntarios sanos, diez de áreas endémicas de LV (San Diego, Mariara y Güigüe) y diez de áreas no endémicas (Valencia). Estos sueros fueron utilizados para obtener el punto de corte del ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Antígeno: rK39 es una secuencia peptídica repetitiva de 39 aminoácidos de una proteína predominante de 230 Kda de *Leishmania chagasi*, la cual fue clonada y expresada en *Escherichia coli* (7). Este fue facilitado por la Dra. Elizabeth Ferrer, docente de la UC e investigadora del Instituto Carlos III de España.

Estandarización de la ELISA: (15). Para determinar la dilución óptima de los sueros y conjugados, se sensibilizaron placas de microtitulación de 96 pozos (marca Dynex Immunolon 2) con 0,5 µgr del antígeno rK39, incubándose toda la noche a 4°C, seguido de bloqueo de los pozos, por una hora a temperatura ambiente, con solución al 1% de BSA en Buffer fosfato salino (PBS) a pH: 7,2. Posteriormente se incubaron las placas por una hora a temperatura ambiente, con diluciones en PBS, con dos de los sueros conocidos positivos y 2 negativos, en forma creciente, desde 1/50 hasta 1/200 y por duplicado, luego se incorporó el conjugado anti-inmunoglobulina humana polivalente acoplada a fosfatasa alcalina (marca Sigma), con títulos crecientes desde 1/2500 a 1/10000. Se reveló la reacción con el sustrato paranitrofenilfosfato (Pierce) y se determinó densidad óptica en lector de ELISA Dynex Mx Revelation a 450nm.

Punto de corte: Se determinó ensayando los sueros del grupo IV en el ELISA-rK39, obteniéndose del resultado de la media de las densidades ópticas obtenidas de estos sueros, más tres desviaciones estándar ($\bar{X} + 3\sigma$), aquellos sueros cuya densidad óptica dio por encima de este punto de corte se consideró positivo.

Validación del elisa-rk39: Luego de la estandarización, la sensibilidad y especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN), así como el índice *Kappa* (*IK*) fueron determinados, por ensayo ELISA-rK39, sueros del grupo I y del II por duplicado, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente.

Reacciones cruzadas: se ensayaron los sueros del grupo III mediante ELISA-rK39 previamente estandarizado.

Procesamiento estadístico: Los resultados obtenidos de los sueros tanto positivos como negativos se expresaron en una tabla 2x2 aplicando la fórmula estadística establecida para cumplir con el objetivo de validación como se describe a continuación (16):

		Diagnóstico Verdadero	
		Positivo	Negativo
ELISA rk39	Positivo	A	B
	Negativo	C	D

$$\text{Sensibilidad} = \frac{A}{A+C} \times 100,$$

$$\text{Especificidad} = \frac{D}{B+D}, \quad \text{VPP} = \frac{A}{A+B} \times 100,$$

$$\text{VPN} = \frac{D}{C+D} \times 100, \quad \text{IK} = \frac{A+D}{N}$$

En el diagnóstico verdadero se incluyen los criterios diagnósticos de LV utilizados para caracterización de los sueros, descritos en la metodología.

RESULTADOS

En la estandarización del ELISA utilizando antígeno rK39, la dilución óptima de los sueros que se obtuvo fue de 1/100 y un título óptimo de conjugado de 1/10000, a estas diluciones se obtuvo una densidad óptica para el control positivo de 0,424 y para el negativo de 0,082, siendo estas las lecturas que discriminaron mejor los sueros positivos de los negativos.

Al ensayar los sueros del grupo IV se obtuvo una densidad óptica media de 0,080 y una desviación estándar de 0,050; obteniéndose un punto de corte de 0,230.

Al ensayar tanto los sueros positivos como los negativos mediante ELISA-rK39 estandarizada, se pudo detectar 92 (92/100) positivos y 100 (100/100) negativos. Y la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) mostrado en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados de la validación del ELISA-rK39

Parámetros de validación	%
Sensibilidad	92
Especificidad	100
VPP	100
VPN	92,6

Por otra parte, al ser ensayado mediante la ELISA-rK39 los treinta sueros caracterizados de otras patologías e infecciones (tuberculosis, lepra, toxoplasmosis, Chagas, leishmaniasis cutánea, VIH/SIDA, malaria), ninguno de ellos presentó reactividad cruzadas con el antígeno. Al determinar índice *Kappa* para medir la concordancia de los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA utilizando rK39 con la prueba de referencia; se obtuvo un resultado de 0,92.

DISCUSION

Se pudo comprobar la alta sensibilidad de la ELISA utilizando antígeno recombinante K39, la cual fue de 92%, comparable con las reportadas en Brasil (4,11), así como utilizándose sueros de casos de leishmaniasis visceral del mediterráneo (8). Se observó que esta sensibilidad fue mayor a la reportada por autores venezolanos quienes evaluaron un área endémica de LV en Venezuela utilizando tiras reactiva con rK39, mostrando una sensibilidad del 88%, no así la especificidad que reportan estos autores si coincide con la obtenida en nuestro estudio (100%) (17), igualmente coincide con trabajos realizado en Sudan (18), así como en la India (19) y Asia (20). Este dato de la especificidad es importante, ya que resuelve el inconveniente de las reacciones cruzadas, tal como se pudo demostrar en este estudio, mostrando además, un valor predictivo positivo de 100% y negativo de 92,6%. Lo cual, se compara con los resultados publicados en otros países, citados anteriormente. Sin embargo, a pesar de que en general coinciden los resultados de sensibilidad y especificidad del antígeno recombinante, es necesario su validación y estandarización en cada laboratorio y área endémica, así como su evaluación con sueros de pacientes en diferentes períodos clínico, debido a que los títulos de anticuerpos pueden variar, ya sea por el sistema inmune del individuo, así como por las características específicas de cada área endémica.

En un estudio realizado en Sudan al utilizar un dipstick rK39, se presentó variabilidad en la sensibilidad y especificidad al utilizar sueros de LV confirmados parasitológicamente comparados con los de aquellos pacientes cuyo diagnóstico no pudo ser confirmado mediante la visualización de los amástigotas en médula ósea, sino a través de otros criterios (clínica, epidemiología, serología mediante el test de aglu-

tinación directa), obteniendo una sensibilidad de 90% y 81% respectivamente, y una especificidad de 99% y 97%, respectivamente a pesar de que son parámetros aceptables, se ve como disminuye en aquellos sueros de pacientes no confirmados parasitológicamente (21).

Otro de los resultados relevantes de este estudio fue el alto grado de concordancia con la prueba de referencias, dado que mostró un índice *Kappa* de 0,92 (15).

Se concluye que al estandarizar el ELISA-rK39 en el Departamento de Parasitología-Valencia, se cuenta en el Estado Carabobo, con una prueba con alta capacidad de discriminación para el diagnóstico de la LV, al comprobar su alta sensibilidad y especificidad, lo que nos permite incorporar de manera confiable esta herramienta en el protocolo de diagnóstico de LV, mejorando la precisión y rapidez del diagnóstico de pacientes procedentes de los diferentes centros asistenciales del Estado Carabobo y áreas de influencia de la Universidad de Carabobo.

AGRADECIMIENTOS. A la Dra. Elizabeth Ferrer por facilitar el antígeno rK39 a través del Instituto Carlos III de España y a la Dra. Marian Ulrich del Instituto de Biomedicina UCV, por su colaboración en la obtención de sueros positivos de LV.

BIBLIOGRAFÍA

- Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996; 14: 417-424.
- Grimaldi G. Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 687-725.
- OMS: Lucha contra la leishmaniasis. Serie de informes técnicos 1990; N° 793. Ginebra p 28-110.
- Badaro R, Reed SG, Barral A, Orge G, Jones TC. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American Visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35:72-78.
- Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 951-958.
- Badaro R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Reed SG, et al. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 1996; 173:758-761.
- Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in african and american visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 775-779.
- Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Salah AB, Bahloul C, Amri F, Dellagi K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:312-320.
- Singh S, Kumari V, Singh N. Predictin kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant k39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9:568-572.
- Carvalho S, Lemos E, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant k39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:321-324
- Braz R, Nascimento E, Martins D, Wilson M, Pearson R, Reed SG, Jerônimo SM. The sensitivity and specificity of *Leishmania Chagasi* recombinant k39 antigen in the diagnosis of american visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67 (4): 344-348.
- Aguilar CM, Fernández E, Fernández R, Cannova DC, Ferrer E, Cabrera Z, Souza WJS, Coutinho. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 15-16.
- PAHO. Epidemiological Bulletin. Vol. 23 N°. 3 2002; p 14.
- Zerpa O, Ulrich M, Benitez M, Avila C, Rodriguez V, Centeno M, Belizario D, Reed SG, Convit J. Epidemiological and immunological aspects of human visceral leishmaniasis on Margarita island Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (8) 1079-1083
- Fernández P, Pértegas DS. Pruebas diagnósticas. *Cad Aten Primaria* 2003; 10:120-124.
- Voller A, Bartlett Bidwell DE. Enzyme immunoassay with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathology* 1978; 31:507-520.
- Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A, Arias J. Value of a dipstick based on recombinant rK39 antigen for differential diagnosis of american visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 2001; 8: 355-357.
- Zijlstra EF, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EAG, El-Hassan AM, Reed SG, Ghalib HW. rK39 Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5: 717-720.
- Singh S, Gilman-Sachs A, Chang KP, Reed SG. Diagnosis and pronostic value of rK39 recombinant antigen in indian leishmaniasis. *J Parasitol* 1995; 81: 1000-1003.
- Qu JQ, Zhong L, Másoom-Yaszai M, Abdur-Rab M, Aksu Hs, Reed SG, Chang KP, Gilman- Sachs A. Serodiagnosis of asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a leishmania kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994; 88: 543-545.
- Ritmeijer K, Melaku Y, Mueller M, Kipngetch, O'Keeffe, Davidson R. Rapid diagnostic test for Sudanese visceral Leishmaniasis. 2006; *Am. J Med Hyg* 74:76-80.