

## Estandarización de la prueba aglutinación directa empleando antígenos autóctonos para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral en zonas endémicas de Venezuela

María Mercedes De Los Ríos Alicandú<sup>1</sup>, Guillermo Terán-Ángel<sup>1</sup>, Rosilved Silva-Basanta<sup>1,2</sup> & Maira Cabrera González<sup>1\*</sup>

La leishmaniasis visceral es la manifestación clínica más severa de la leishmaniasis ya que puede ser fatal si no se administra el tratamiento adecuado. En Venezuela el foco mas activo es la isla de Margarita, donde principalmente se ven afectados niños de 0 a 9 años. De ahí la importancia de un diagnóstico temprano, a menudo difícil en las áreas endémicas. Si bien la prueba de oro para el diagnóstico de leishmaniasis visceral es la detección directa de los parásitos, la toma de muestra es bastante invasiva e incomoda para el paciente. Más aún, la mayoría de estas técnicas son costosas, complejas y de larga ejecución. Otros métodos indirectos, como la ELISA (usando antígenos crudos o definidos del parásito) requieren de equipos y personal especializados; lo cual es difícil de cubrir en las zonas endémicas. Recientemente validamos en Venezuela, el uso de una técnica de aglutinación directa (KIT Biomedical Research) evidenciándose una elevada sensibilidad y especificidad. El antígeno empleado en esta prueba es *Leishmania donovani*. Sin embargo, en nuestro país el agente causal de esta parasitosis es *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*). Otro aspecto a considerar es la variación antigénica regional que sufre un parásito al interactuar con el vector local y con factores del hospedero; además del costo; por lo tanto desarrollamos una prueba de aglutinación directa un antígeno de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) obtenido de perros de la isla de Margarita. Éste se comparó con la prueba comercial, ensayando sueros de pacientes de leishmaniasis visceral confirmados y controles. Empleando como patrón de oro el ELISA con rK39, obtuvimos en ambos una sensibilidad del 100%; y una especificidad del 82,85 % para la prueba comercial y 98,78% para el nuestro, lo cual pone en manifiesto la relación específica entre los anticuerpos de pacientes venezolanos y el antígeno predominante del país.

**Palabras clave:** leishmaniasis visceral, diagnóstico, pruebas de aglutinación, *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*), humanos, Venezuela.

### INTRODUCCIÓN

La *Leishmaniasis* visceral (LV) es una de las manifestaciones más severas de la *Leishmaniasis*. Es endémica en varias partes de África, India y América Latina causando unos 500.000 casos y más de 80.000 muertes por año (OPS, 1996). Salvo en pocas excepciones, esta enfermedad es causada por parásitos de las especies *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*. El agente causal de LV en Venezuela es

*Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) (Mauricio *et al.*, 1999).

En nuestro país, representa un problema de salud pública ya que en la última década, se ha reportado un incremento en el número de afectados (aproximadamente 50 casos por año), principalmente niños menores de diez años (Sánchez & Tapia, 2005). Esta enfermedad se ha diagnosticado en focos dispersos en las áreas central, sur este y oeste del país (Zulueta *et al.*, 1999). En la actualidad, el foco endémico mas activo es el estado Nueva Esparta, en el cual se ha señalado un importante incremento en la incidencia de esta enfermedad comparado con la incidencia registrada para las otras entidades federales del país (Zerpa *et al.*, 2002).

<sup>1</sup> Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, apartado 4043, Caracas 1010A, Venezuela.

<sup>2</sup> Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

\*Autor de correspondencia: mairacab@gmail.com

El síndrome clínico de LV comprende cuadros de fiebre, pérdida de peso, hepato-esplenomegalia, anemia, leucopenia, hiperglobulinemia con la presencia de anticuerpos específicos o no contra el parásito. Igualmente se observa la presencia de auto-anticuerpos y complejos inmunes en los órganos afectados (Bryceson, 1989; Pearson & Wilson, 1989; Smith *et al.*, 1989). La LV es considerada una enfermedad crónica con alto potencial de letalidad y el éxito de su curación depende del diagnóstico temprano y de la instauración de la terapéutica de forma oportuna y precoz (Abdallah *et al.*, 2004; Adhya *et al.*, 1995; Allain & Kagan 1975). Sin embargo, el diagnóstico de la LV es difícil, el mismo se determina según los antecedentes epidemiológicos del paciente, la clínica, la visualización directa del parásito y los resultados de las pruebas serológicas. Si bien la identificación del parásito en aspirados esplénicos, de médula ósea y ganglios linfáticos, es considerada la prueba de oro en el diagnóstico de esta enfermedad, en la práctica resulta difícil e inconveniente su aplicación debido a las dificultades en obtener y examinar los tejidos de los pacientes. Por lo que se ha incrementado el uso de los métodos serológicos (Sundar & Rai, 2002). En Venezuela, acorde a los lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2002), las pruebas serológicas constituyen las pruebas confirmatorias que soportan al diagnóstico clínico y epidemiológico.

Entre las pruebas inmunoserológicas más utilizadas para el diagnóstico de LV figuran: el test de ELISA con antígenos crudos y definidos de *Leishmania* tales como el rK39 (Hommel *et al.*, 1978; Anthony *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1995), test de anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT) (Duxbury & Sadun, 1964; Badaró *et al.*, 1983) y el test de aglutinación directa (DAT). Este último, permanece como la herramienta de primera línea en el diagnóstico de la LV en muchos países en vías de desarrollo, ya que es un test sencillo, con altas sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, fácil de realizar, sin requerimientos de equipos y materiales especializados (Boelaert *et al.*, 1999a, 1999b, Schallig *et al.*, 2001, 2002), no invasivo (Zijlstra *et al.*, 1992) y aplicable para programas y estudios seroepidemiológicos a gran escala (el Harith. *et al.*, 1987). Actualmente se cuenta con el FD DAT comercial (KIT Biomedical Research) el cual en estudios reciente, demostramos su aplicabilidad en el diagnóstico de LV en Venezuela (Terán-Ángel *et al.*, 2007; 2010). Sin embargo, el mismo es fabricado

con promastigotes de *L. donovani*; lo cual es una limitación ya que es muy importante considerar la variación antigénica regional que sufre el parásito al interactuar con el vector local y con factores del hospedero; además del costo del test comercial. Por ello nos propusimos desarrollar una prueba de DAT con un antígeno de cepa autóctona de *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) obtenida de perros de la isla de Margarita, Edo. Nueva Esparta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de suero

Se estudiaron veinte sueros de pacientes residentes del estado Nueva Esparta y diagnosticados con LV por criterios clínicos, epidemiológicos y serológicos (ELISA-rK39 positivo); catorce sueros de pacientes con otras patologías: dos sueros de pacientes con *Leishmaniasis* cutánea difusa, ocho sueros de pacientes con mal de Chagas, dos sueros de pacientes con tuberculosis (TBC) y dos sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico.

Como controles se estudiaron diez sueros de individuos voluntarios sanos de zonas no endémicas del país y diez de zonas endémicas. Todas estas muestras fueron suministradas por los laboratorios de Inmunoparasitología, Inmunología II, Fisiopatología y Tuberculosis del Instituto de Biomedicina, UCV. El trabajo contó con la aprobación de Comité de Ética del instituto de Biomedicina.

### Cepa empleada para el estudio

El test fue realizado con la cepa de MCAN/VE/98/IBO-78 (*Leishmania infantum*), la cual fue aislada a partir de la médula ósea de un perro infectado procedente del estado Nueva Esparta.

### Cultivo de los parásitos en medio líquido Schneider's

El parásito se cultivó estérilmente usando el medio líquido Schneider's, pH de 7,2; suplementado con Suero Fetal Bovino al 10% y con antibióticos (20 U/mL de penicilina, 20 mg/mL de estreptomycin y 0,1% de gentamicina)  $1 \times 10^5$  parásitos de *Leishmania infantum* (cepa MCAN/VE/98/IBO-78) fueron cultivados en frascos de cultivo de 10 y 50 mL en oscuridad a 26°C, hasta llegar a la fase tardía de crecimiento, la cual según nuestras condiciones fue al quinto día de cultivo.

### Preparación del antígeno

Los parásitos en su fase tardía de crecimiento, fueron tratados con tripsina al 0,4 % en solución de Locke (a pH 7,70; 15M de NaCl; 14mM de glucosa; 5,4mM de KCl; 1,8mM de  $\text{CaCl}_2$  y 2,4mM de  $\text{NaHCO}_3$ ) a 37°C durante 45 min. Luego de centrifugación por 15 min. a 2700g a 4°C; estos fueron fijados por 20 horas a 4°C con formaldehído (al 2%) en solución de Locke. Posterior a dos lavados con 0,9% NaCl frío, los promastigotes fueron coloreados al mantenerlos 120 minutos en una solución salina fría con 1% de citrato de sodio (34mM) más 0,02% de azul brillante de Coomassie. Finalmente, se ajustaron a  $100 \times 10^6$  parásitos/mL en solución salina con 1% de formalina, y se mantuvieron en dicha solución a 4°C hasta su utilización.

### Ensayo del test de aglutinación

El test de aglutinación directa con el antígeno local (DATv) fue realizado con algunas modificaciones de lo reportado previamente (El Harith *et al.*, 1988; Terán-Ángel *et al.*, 2007).

Las muestras de suero se diluyeron en solución salina (0,9% NaCl), 1% suero fetal bovino con 0,8%  $\beta$ -mercaptoetanol. Se dispusieron en placas de 96 pozos, fondo en "V" (Greiner, Alemania), y se realizaron diluciones seriadas (desde 1/100 hasta 1/102400) para cada muestra a ensayar. El antígeno mantenido en formalina (DATv) se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^7$  promastigotes / mL y se le adicionó a las muestras de suero en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . Se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente para posteriormente realizar la lectura visualmente. El título de anticuerpos fue tomado como el inverso de la dilución el último pozo donde se observó aglutinación, la cual se observa como largos botones azules. La presencia de un botón compacto representa a los pozos negativos.

Para el test comercial (FD-DAT, Biomedical Research) se procedió de igual forma, sin embargo los sueros fueron diluidos en una solución de 0,9% NaCl, 0,8%  $\beta$ -mercaptoetanol sin suero fetal bovino.

### Análisis estadísticos

Análisis mediante Curvas de Características Operativas del Receptor (Curvas ROC): Con los títulos de

anticuerpos resultantes para los sueros ensayados con los dos test de aglutinación evaluados, se ordenaron los datos (resultados de distribución discreta poltómica) y se construyeron tablas de contingencia 2x2 para cada punto de corte (título de anticuerpo) posible. Se determinó la sensibilidad, definida como la probabilidad de detectar a los verdaderos positivos; y especificidad, definida como la probabilidad de detectar a los verdaderos negativos, en cada punto de corte a fin de graficar la dispersión de pares (1-especificidad, sensibilidad) y obtener las curvas ROC (Goodenough *et al.*, 1974; Burgueño *et al.*, 1995) del test desarrollado (DATv) y del FD-DAT. Las curvas ROC fueron analizadas por el programa informático EpiDat v.3.1 (OPS, Xunta de Galicia, España). Para cada una se determinó: el Área Bajo la Curva (ABC), la cual define la probabilidad de que el resultado de la prueba evaluada resulte más alterada en un individuo enfermo en comparación a uno sano; y el error estándar asociado al ABC; además de sus respectivos intervalos de confianza. Por otra parte, se evaluó mediante una prueba  $\chi^2$  la homogeneidad de las áreas, a fin de determinar las similitudes entre los dos test de aglutinación.

Finalmente, se procedió a la elección del punto de corte más adecuado en cada ensayo como aquél más próximo a la esquina superior izquierda de la curva (punto con mayor precisión relativa de la prueba).

Análisis de validez y seguridad de la pruebas: A partir de los resultados obtenidos y empleando los puntos de corte determinados según las curvas ROC, se construyó para cada prueba una tabla de contingencia 2x2, que fueron analizadas a fin de establecer los parámetros de validez y seguridad. Dichos parámetros fueron calculados aplicando las correcciones para la evaluación de pruebas diagnósticas con patrones de referencia imperfectos (Silva, 1988; Valenstein, 1990), se empleó como patrón de referencia a la prueba de ELISA -rK39, cuyas especificidad y sensibilidad, han sido reportadas, ambas, alrededor del 97% (Burn *et al.*, 1993; Qu *et al.*, 1994; Zijlstra *et al.*, 1998; Ozensoy *et al.*, 1998; Sreenivas *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2002; Salotra *et al.*, 2003). Se determinaron los parámetros sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (probabilidad de que un sujeto esté enfermo dado que resultó positivo en el test), valor predictivo negativo (probabilidad de que un sujeto esté sano dado que resultó negativo en el test) y razón de verosimilitud

(probabilidad de un resultado particular en enfermos en base a la probabilidad del mismo resultado en sanos), además de sus respectivos intervalos de confianza. Los análisis estadísticos se realizaron usando los programas informáticos EpiDat v.3.1 (OPS, Xunta de Galicia, España) y “Calculadora Pruebas Diagnósticas” v. 1.0.2 (Unidad de Bioestadística Clínica, Hospital Ramón y Cajal, España).

## RESULTADOS

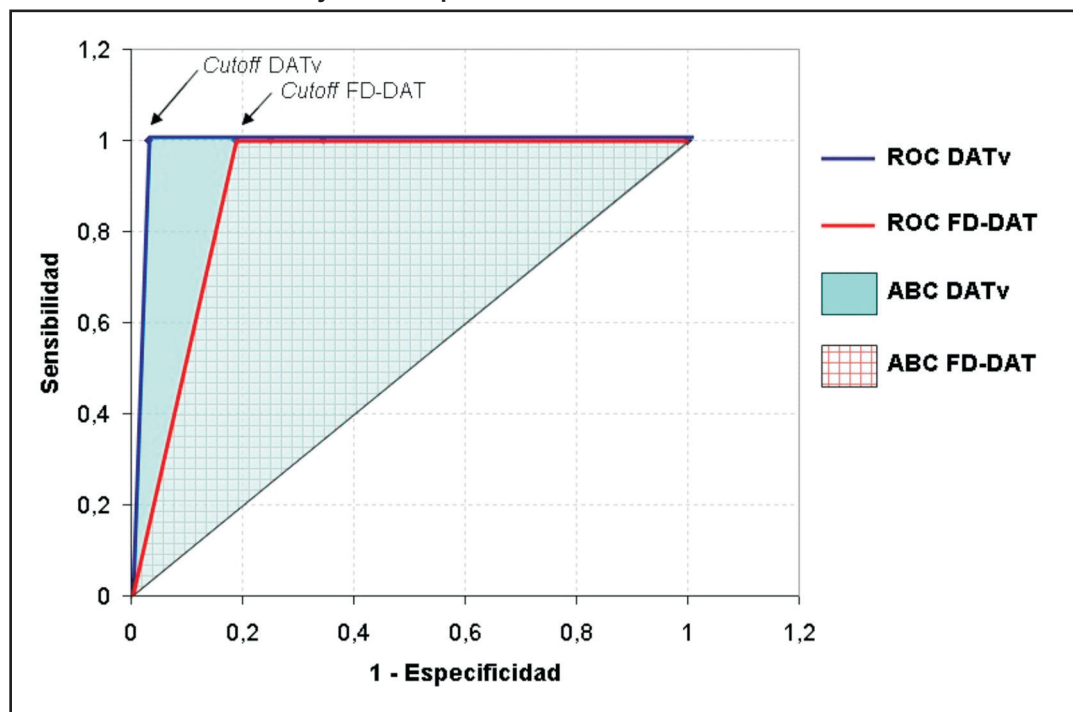
Mediante la aplicación de la prueba de aglutinación directa autóctona (DATv) o comercial (FD DAT) se obtuvieron diferentes títulos de anticuerpos para los grupos de pacientes y controles, los cuales fueron utilizados para construir las curvas ROC para cada prueba. La Fig. 1 muestra las curvas ROC resultantes en cada caso. Se aprecia una mayor Área Bajo la Curva para el DATv en comparación con el FD-DAT; por otra parte, el punto de corte o “cut-off” de elección del ensayo desarrollado DATv fue 1/400, mientras que para FD-DAT resultó mayor, 1/800. Se

calcularon también los descriptores estadísticos del análisis ROC (Tabla I).

Al establecer los puntos de corte para cada prueba, los resultados de los títulos de anticuerpos se agruparon en tres categorías: controles, enfermos de LV y otras patologías (Fig. 2). Como puede observarse, todos los pacientes con LV confirmada fueron positivos para ambos test. Se presentaron falsos positivos en otras patologías; sin embargo la reacción cruzada fue menor en nuestro ensayo (DATv: en TBC aglutinantes 0/2 y en tripanosomiasis 1/8, FD-DAT: en TBC aglutinantes 2/2 y en tripanosomiasis 4/8), además hubo menos falsos positivos en el grupo de controles.

La Tabla II representa los parámetros de validez de las pruebas. Se observa que ambos tests presentan sensibilidad de 100%, mientras que la especificidad del DATv es considerablemente mayor en comparación con el FD-DAT (98,78% y 82,85% respectivamente). Los demás parámetros determinados también fueron superiores en el DATv con respecto al FD-DAT.

**Fig. 1. Comparación de las curvas ROC para el DATv y FD-DAT. Se muestran las Áreas Bajo la Curva (ABC) de las gráficas generadas para cada prueba. Los “cut-off” para el DATv y FD-DAT fueron estimados en 1/400 y 1/800 respectivamente.**



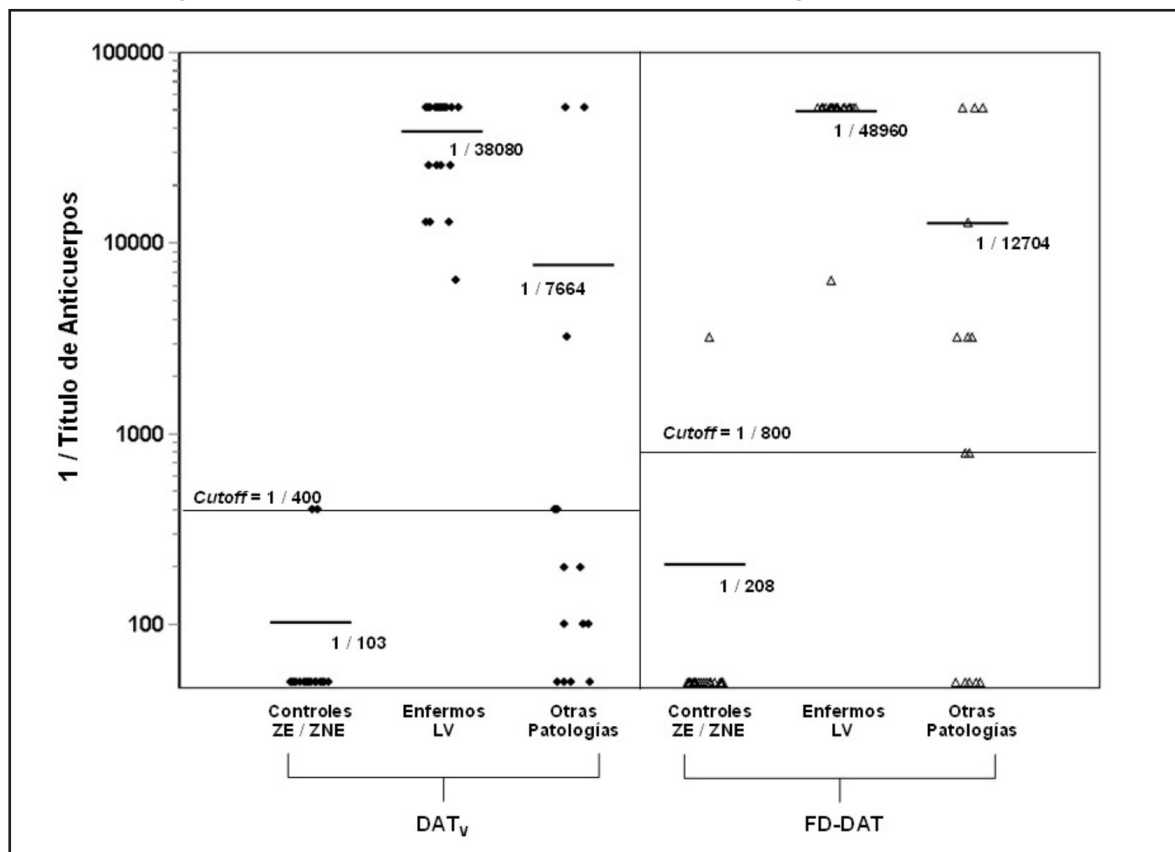
**Tabla I. Descriptores estadísticos de las curvas ROC para el DATv y FD-DAT.**

| Prueba | Área Bajo la Curva | Error estándar*           | Homogeneidad de áreas*<br>( $\chi^2$ ) |
|--------|--------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| DATv   | 0,9063             | 0,0480<br>(0,8121-1,0004) | P=0,0056                               |
| FD-DAT | 0,8594             | 0,0578<br>(0,7462-0,9726) |                                        |

Los valores entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza (95%).

\* Según Hanley & McNeil (1983).

**Fig. 2. Resultados de las pruebas de aglutinación (DATv y FD-DAT) para la determinación de anticuerpos anti-Leishmania en humanos. ZE: zonas endémicas, ZNE: zonas no endémicas, LV: leishmaniasis visceral. En la gráfica se aprecian los valores de las medias de cada grupo (líneas horizontales).**



**Tabla II. Sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razones de verosimilitud de las dos pruebas diagnósticas evaluadas.**

| Descriptor                    | DATv                      | FD-DAT                   |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Sensibilidad (%)              | 100<br>(100 – 100)        | 100<br>(100 – 100)       |
| Especificidad (%)             | 98,78<br>(94,99 – 100)    | 82,85<br>(69,79 – 95,91) |
| Valor predictivo positivo (%) | 98,13<br>(92,33 – 100)    | 78,64<br>(62,89 – 94,40) |
| Valor predictivo negativo (%) | 100<br>(100 – 100)        | 100<br>(100 – 100)       |
| Razón de verosimilitud        | 86,42<br>(12,35 – 604,73) | 6,08<br>(2,95 – 12,52)   |

Los parámetros de cada prueba fueron obtenidos al compararlas contra ELISA –rK39. Los valores entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza (95%).

## DISCUSIÓN

En las últimas décadas, en Venezuela, se ha observado un incremento en la incidencia de LV, particularmente en los estados Falcón, Lara, Guárico, Anzoátegui, Delta Amacuro, Sucre y Nueva Esparta. Éste último se ha convertido en un foco muy importante en el país (Zulueta *et al.* 1999, Zerpa *et al.*, 2002), ya que es en esta entidad donde se ha registrado un mayor porcentaje de perros infectados que actúan como reservorio natural de la enfermedad. De igual modo, se ha evidenciado que la mayoría de los casos de infección se producen en niños de 0 a 9 años de edad; hecho dramático que impulsa el desarrollo de técnicas rápidas y certeras de diagnóstico para evitar las repercusiones de la LV en los niños (Zerpa *et al.*, 2003).

Hasta el presente dos institutos en el mundo ofrecen comercialmente dos antígenos para el test de aglutinación directa; estos son: el Instituto de Medicina Tropical del Príncipe Leopoldo de Antwerp, Bélgica y el del Instituto de Medicina Tropical de Ámsterdam, Holanda, (Biomedical Research). Ambas pruebas comerciales están fabricadas con un antígeno preparado a partir de promastigotes de *L. donovani* MHOM/SD/68/1S (Meredith *et al.*, 1995). Éste ha sido evaluado en numerosas regiones endémicas de LV alrededor del mundo incluyendo a nuestro país (Terán-Ángel *et al.*, 2007) y ha presentado sensibilidad y especificidad variables en cada una de ellas. En un metanálisis realizado en el año 2006 para evaluar el desempeño del FD-DAT desde su introducción al diagnóstico de LV desde 1986 hasta 2004; se concluyó que a pesar de presentar en la mayoría de los casos sensibilidad mayor

del 90% y especificidad comúnmente cercana al 100%, es necesaria la determinación de estos parámetros en las zonas endémicas en las que se inicia su empleo debido a la heterogenicidad de ambos valores con respecto a la localización geográfica de los estudios (Chappuis *et al.*, 2007). En ese contexto, es importante considerar la variación antigénica regional que sufre un parásito en sus epítopes al interactuar con el vector local y con factores de los hospedadores. Por ello, nos propusimos desarrollar una prueba de aglutinación directa empleando como antígeno promastigotes de *L. infantum* de la isla de Margarita, Edo. Nueva Esparta; que además, abarataría los costos de adquisición del kit frente al existente. Más aún, nuestro test sería más accesible en el medio rural en el cual predomina la enfermedad en el país; además de impulsar la producción nacional.

En el presente estudio, se comparó la efectividad de las pruebas DATv con el FD-DAT; para lo cual se llevó a cabo el análisis y graficación de curva ROC y la determinación de los parámetros de validez y seguridad de ambas pruebas.

Clásicamente, la exactitud de una prueba diagnóstica se ha evaluado en función de la sensibilidad y la especificidad, sin contar que éstas varían en función del punto de corte o “cut-off” elegido como criterio discerniente entre la población sana y la enferma. Este hecho se ha convertido en un determinante de la evaluación del FD-DAT, puesto que se han empleado numerosos puntos de corte en las diversas investigaciones: 1:800 (Singla *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2005; Terán-Ángel *et al.*, 2007), 1:1600 (el

Harith *et al.*, 1986; Meredith *et al.*, 1995), 1: 6400 (el Harith *et al.*, 1988), 1:3200 (Mohebalí *et al.*, 2006); entre otros. Por lo tanto, se empleó una forma más global de conocer la calidad de la prueba diagnóstica desarrollada en un espectro de puntos de corte posibles: la curva ROC (Goodenough *et al.*, 1974), la cual es un instrumento con capacidad discriminativa, entre las condiciones de sano y enfermo, en una prueba a lo largo de todos los puntos de corte permitidos. Esto dibuja una curva en un sistema de ejes cartesianos. En el eje de ordenadas se ubican distintos valores de sensibilidad y en las abscisas las tasas de falsos positivos (1- especificidad), reflejando todos los pares de sensibilidad/especificidad para cada punto de corte (Domínguez Alonso & González Suárez, 2002). Por tanto, el valor de sensibilidad aumenta a medida que la especificidad disminuye. Estas gráficas son útiles para relacionar el equilibrio entre sensibilidad y especificidad de una prueba y permitir decidir cuál es el mejor punto de corte (Streiner & Cairney, 2007) sin que el análisis sea afectado por la distribución paramétrica o no paramétrica de los resultados.

En nuestro trabajo, los descriptores permitieron la comparación entre los dos test de aglutinación, estos fueron: Área Bajo la Curva (ABC), definida como la probabilidad de que el resultado de la prueba evaluada resulte más alterada en un individuo enfermo (Burgueño *et al.*, 1995). Su rango varía entre 1 (discriminación perfecta) y 0,5 (la prueba no es capaz de discernir enfermos de sanos con buena precisión diagnóstica) (Domínguez Alonso & González Suarez, 2002). Puesto que este parámetro es estimado, existe un error estándar asociado denominado EE (Streiner & Cairney, 2007). En esta investigación y, a pesar de que ambos test dibujan una curva ROC muy por encima de la diagonal que refleja el 0,5 de discriminación diagnóstica, se obtuvo una mayor ABC para el test desarrollado (DATv) en comparación con el ABC resultante del FD-DAT, implicando una mayor precisión diagnóstica del primero, específicamente en los focos endémicos de Nueva Esparta, Venezuela, evaluados.

Por otra parte, se tiene la evaluación de Homogeneidad de las áreas p, que establece las similitudes entre áreas de dos curvas trazadas, siempre que ambas presenten coincidencias en sus resultados. Mientras este valor se aproxime a 1, mayor será la homogeneidad de las ABC de los ensayos comparados (Francia *et al.*, 2006). En este caso, la homogeneidad

de las ABC de ambos ensayos dista mucho de 1, planteándose así que existen discrepancias importantes en cuanto a sensibilidad y especificidad entre los tests a considerar.

Una vez determinados los puntos de corte de cada prueba de aglutinación y con los resultados obtenidos de títulos de los sueros evaluados, se construyeron tablas de contingencia 2x2, considerando la corrección asociada a un patrón de referencia imperfecto (Valenstein, 1990): ELISA-rK39, a fin de determinar sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razón de verosimilitud de las dos pruebas. La validación de herramientas diagnósticas para LV deberían basarse en la comprobación parasitológica como método de referencia; sin embargo, ésta no es siempre posible de realizar; además de tampoco ser un patrón diagnóstico perfecto (depende de la carga parasitaria, el material obtenido por aspirado y la experticia del observador) (Zijlstra *et al.*, 1991). Por tanto, la OPS considera de igual relevancia y precisión el ELISA basado en antígeno rK39 (OPS, 2002). Para esta técnica se ha reportado una especificidad y una sensibilidad ambas de 97%, lo que lo convierte en un patrón de referencia imperfecto al emplearse para la evaluación de métodos diagnósticos de LV. Por lo tanto, y siendo ese el caso en esta investigación se deben emplear las fórmulas de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y razón de verosimilitud ajustadas a esta condición del patrón o “gold standard”.

Tanto FD-DAT como DATv presentaron una sensibilidad del 100%, como se ha reportado anteriormente en Etiopía, Kenya y Brasil (el Harith *et al.*, 1986; Schallig *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005; Da Silva *et al.*, 2006) lo que refleja la capacidad de los ensayos en la detección de los casos de LV.

Para ambas pruebas se evidenciaron resultados similares para el grupo de enfermos, cuyos títulos se mantuvieron por encima del punto de corte 1:400 (DATv) ó 1:800 (FD-DAT), afirmando así el diagnóstico positivo que presentaba el paciente. Sin embargo, se presentaron falsos positivos en otras patologías: en el FD-DAT hubo reacción cruzada con mal de Chagas, LUPUS y tuberculosis, como se ha reportado en Brasil (Silva *et al.*, 2005) y Kenya (el Harith *et al.*, 1986) para mal de Chagas y en India para tuberculosis (Kumar *et al.*, 2006); mientras que en DATv solamente se presentar reacción cruzada con los sueros de mal de Chagas. En otros estudios

evaluando el FD-DAT no evidencian ninguna reacción cruzada (Meredith *et al.*, 1995; Schallig *et al.*, 2002); sugieren que para las zonas endémicas de LV, también endémicas para tripanosomiasis, se debe elevar el punto de corte del ensayo (Harith *et al.*, 1986), lo cual puede acarrear falsos negativos. La reacción cruzada presentada por el DATv y por FD-DAT con mal de Chagas no afecta la validez de los resultados, ya que se debe tomar en consideración que ambas enfermedades son causadas por parásitos de la misma familia (por lo que es probable que compartan antígenos) además de que las manifestaciones clínicas de estas parasitosis son suficientemente disímiles entre sí, por lo que en el diagnóstico diferencial predomina la clínica. Más es importante mencionar que la isla de Margarita, estado Nueva Esparta no se considera zona endémica para tripanosomiasis (Añez *et al.*, 2004), lo que incrementa el valor diagnóstico del test desarrollado frente al existente. Además en DATv hubo menos falsos positivos en el grupo de controles, por lo que resulta una mayor especificidad de éste comparado con el FD-DAT: DATv obtuvo 98,78% y el FD-DAT 82,85%. En referencia a los valores predictivos positivos, se favorece aún más el DATv con un valor de 98,13% versus 78,64% del FD-DAT. Y la razón de verosimilitud de 86,42% del DATv en comparación con el 6,08% del FD-DAT, implica que en referencia a la prevalencia de la enfermedad en la población, el DATv es mejor que el FD-DAT para el diagnóstico de LV en el foco estudiado. Se han reportado con anterioridad disminuciones en la sensibilidad y especificidad del FD-DAT fuera de Asia y África (Chappuis *et al.*, 2007). A pesar de considerarse comparables, en estudios anteriores se ha obtenido mayor sensibilidad y especificidad con el antígeno acuoso que con el liofilizado (Abdallah *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2006), lo que sugiere que durante el proceso de liofilización el antígeno resulta afectado.

Es importante reiterar que el DATv es válido por su alta sensibilidad y especificidad como criterio para diagnosticar LV en el estado Nueva Esparta, Venezuela. Estos resultados permiten afirmar que existe respuesta de anticuerpos contra antígenos propios de especie de *Leishmania infantum* vs *Leishmania donovani* en el país, implicando la “regionalización” del parásito al entrar en contacto con los hospederos de la isla de Margarita; esto se puede aprovechar para el desarrollo de test serológicos más sofisticados de los existentes en el mercado preparados con promastigotes de *L. donovani*.

## AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo fue financiado por el proyecto grupal de FONACIT N° G2005000375.

## Standardization of direct agglutination test using native antigens for diagnosis of visceral leishmaniasis endemic areas of Venezuela

## SUMMARY

Visceral leishmaniasis is the most severe form of leishmaniasis, and it is deadly if left untreated. Margarita Island is the most active visceral leishmaniasis focus in Venezuela, where most of the affected population are children between 0 to 9 years old. Therefore, an early diagnosis is very important, unfortunately, this is difficult in endemic areas. Although, the gold standard method for visceral leishmaniasis diagnosis is parasite detection; the sample retrieval is very inconvenient for patients. Moreover, most techniques are time-consuming, expensive and difficult to carry out. Other indirect methods, such as ELISA (using crude or defined *Leishmania* antigens), require specialised technicians and equipment, which is unsuitable in the field areas. Recently we validated the performance of a direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Venezuela (KIT Biomedical Research). It showed elevated sensitivity and specificity. Nevertheless, this test includes *Leishmania donovani* as antigen, whereas visceral leishmaniasis in our country is caused by *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*). Moreover, parasite antigenic variation as a result of vector-parasite and host-parasite interaction is an important factor to be considered; in addition to the costs. Therefore, we developed a direct agglutination test using *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) isolated from a naturally infected dog of Margarita Island. This was compared to the available commercial kit, and testing confirmed visceral leishmaniasis patients and healthy controls. Using rK39 ELISA as gold standard, it was found 100% sensitivity for both tests, and 82.85 % specificity for the commercial test and 98.78% for the local one, which shows the relationship between dominant local antigens and antibody's specificity displayed by Venezuelan patients.

**Key words:** visceral leishmaniasis, diagnosis, agglutination test, *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*), human, Venezuela

## REFERENCIAS

- Abdallah K. A., Nour B. Y., Schallig H. D., Mergani A., Hamid Z., Elkarim A. A., *et al.* (2004). Evaluation of the direct agglutination test based on freeze-dried *Leishmania donovani* promastigotes for the serodiagnosis of visceral *Leishmaniasis* in Sudanese patients. *Trop. Med. Int. Health.* **9**: 1127-1131.
- Adhya S., Chatterjee M., Hassan M. Q., Mukherjee S. & Sen S. (1995). Detection of *Leishmania* in the blood of early kala-azar patients with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 622-624.
- Allain D. S. & Kagan I. G. (1975). A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**: 232-236.
- Anthony R. L., Christensen H. A. & Johnson C. M. (1980). Micro enzyme-linked immunoassay (ELISA) for the diagnosis of New World leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**: 190-194.
- Añez N., Crisante G. & Rojas A. (2004). Update on Chagas disease in Venezuela-a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 781-787.
- Badaró R., Reed S. G. & Carvalho E. M. (1983). Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. *Am. J. Trop. Hyg. Med.* **32**: 480-484.
- Boelaert M., El-Safi S., Jacquet D., de Muynck A., van der Stuyft P. & Le Ray D. (1999a). Operational validation of the direct agglutination test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **60**: 129-134.
- Boelaert M., El-Safi S., Mousa H., Githure J., Mbatia P. A., Gurubacharya V., *et al.* (1999b). Multi-centre evaluation of repeatability and reproducibility of the direct agglutination test for visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health.* **4**: 31-37.
- Bryceson, A. (1989). Leishmaniasis after Adler. *Isr. J. Med. Sci.* **25**: 209-213.
- Burgueño M. J., García-Bastos J. L. & González-Buitrago J. M. (1995). Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Med. Clin. (Barc).* **104**: 661-670.
- Burns J. M., Shreffler W. G., Benson D. R., Ghalib H. W., Badaró R. & Reed S. G. (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **90**: 775-779.
- Chappuis F., Rijal S., Soto A., Menten J. & Boelaert M. (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ.* **333**: 723.
- Da-Silva E. S., vander Meide W. F., Schoone G. J., Gontijo C. M., Schallig H. D. & Brazil R. P. (2006). Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commun.* **30**: 637-643.
- Domínguez Alonso E. & González Suárez R. (2002). Análisis de las curvas receiver-operating characteristic: un método útil para evaluar procedimientos diagnósticos. *Rev. Cubana Endocrinol.* **13**: 173-180.
- Duxbury R. E. & Sadun E. H. (1964). Fluorescent antibody test for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **13**: 525-529.
- el Harith A. E., Kolk A. H., Kager P. A., Leeuwenburg J., Faber F. J., Muigai R., *et al.* (1987). Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 603-606.
- el Harith A., Kolk A. H., Leeuwenburg J., Muigai R., Huigen E., Jelsma T., *et al.* (1988). Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1321-1325.
- Francia C., Barcala E., Puente B., Fernández D., Fernández G. (2006). Validación del ELISA para la detección de anticuerpos frente a infecciones

- de *Brucella abortus* en ganado vacuno. En: Memorias del XIV Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes. Eds.: Baños P., Benedito J., Morondo M., Hernández J., López C. Santiago de Compostela, España.
- Goodenough D. J., Rossmann K. & Lusted L. B. (1974). Radiographic applications of receiver operating characteristic (ROC) curves. *Radiology*. **110**: 89-95.
- Hanley & McNeil (1983). A method of comparing the areas under receiver operating characteristics curves derived from the same cases. *Radiology*. **148**: 839-843.
- Harith A. E., Kolk A. H., Kager P. A., Leeuwenburg J., Muigai R., Kiugu S., *et al.* (1986) A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**: 583-587.
- Hommel M., Peters W., Ranque J., Quilici M. & Lanotte G. (1978). The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **72**: 213-218.
- Kumar R., Pai K., Kumar P., Pandey H. P. & Sundar S. (2006). Sero-epidemiological study of kala-azar in a village of Varanasi district India. *Trop Med Int Health*. **11**: 41-48.
- Mauricio I. L., Howard M. K., Stothard J. R. & Miles M. A. (1999). Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. **119**: 237-246.
- Meredith S. E., Kroon N. C., Sondorp E., Seaman J., Goris M. G., van Ingen C. W., *et al.* (1995). Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* **33**: 1742-1745.
- Mohebbi M., Edrissian G., Nadim A., Hajjarian H., Akhoundi B., Hooshmand B, *et al.* (2006). Application of direct agglutination test (DAT) for the diagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis in Iran. *Iranian J. Parasitol.* **1**: 15-25.
- OPS (1996). *Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio*. Cuaderno técnico. **44**: 1-52.
- OPS (2002). *Definiciones de Caso: leishmaniasis Visceral*. Boletín Epidemiológico. **23**: 14.
- Ozensoy S., Ozbel Y., Turgay N., Alkan M. Z., Gul K., Gilman-Sachs A., *et al.* (1998). Serodiagnosis and epidemiology of visceral *Leishmaniasis* in Turkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59**: 363-369.
- Pearson R. D. & Wilson M. E. (1989). Host defenses against prototypical intracellular protozoans, The *Leishmania*. Parasitic infection in the compromised host. En M., W.P.D.a.G.R. (ed.). Marcel Dekker, New York, p. 31.
- Qu J. Q., Zhong L., Masoom-Yasinzai M., Abdur-Rab M., Aksu H. S., Reed S. G., *et al.* (1994). Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**: 543-545.
- Salotra P., Sreenivas G., Beena K. R., Mukherjee A. & Ramesh V. (2003). Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *J. Clin. Pathol.* **56**: 840-843.
- Sánchez M. & Tapia F. (2005). Inmunología de la leishmaniasis Visceral Canina. *Bol. Mal. Salud Amb.* **45**: 81-88.
- Schallig H. D., Schoone G. J., Kroon C.C., Hailu A., Chappuis F. & Veeken H. (2001). Development and application of simple diagnostic tools for visceral *Leishmaniasis*. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**: 69-71.
- Schallig H. D., Canto-Cavaleiro M. & da Silva E. S. (2002). Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **97**: 1015-1018.
- Silva L. C. (1988). Métodos Estadísticos para la Investigación Epidemiológica. Instituto Vasco de Estadística, Eustat, Bilbao, España.

- Silva E. S., Schoone G. J., Gontijo C. M., Brazil R. P., Pacheco R. S. & Schallig H.D. (2005). Application of direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais Brazil. *Kinetoplastid Biol Dis.* **4**: 4.
- Singh S., Gilman-Sachs A., Chang K. P. & Reed S. G. (1995). Diagnostic and prognostic value of k39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. *J. Parasitol.* **81**: 1000-1003.
- Singh S., Kumari V. & Singh N. (2002). Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 568-572.
- Singla N., Singh G. S., Sundar S. & Vinayak V. K. (1993). Evaluation of the direct agglutination test as an immunodiagnostic tool for kala-azar in India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 276-278.
- Smith D., Gazzard B., Lindley R. P., Darwish A., Reed C., Bryceson A. D. & Evans D. A. (1989). Visceral leishmaniasis (kala azar) in a patient with AIDS. *Aids.* **3**: 41-43.
- Sreenivas G., Ansari N. A., Singh R., Subba Raju B. V., Bhatheja R., Negi N. S., et al. (2002). Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. *Br. J. Biomed. Sci.* **59**: 218-222.
- Streiner D.L. & Cairney J. (2007). What's under the ROC? An introduction to receiver operating characteristics curves. *Can. J. Psychiatry.* **52**: 121-128.
- Sundar S. & Rai M. (2002). Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 951-958.
- Sundar S., Singh R. K., Maurya R., Kumar B., Chhabra A., Singh V., et al. (2006). Serological diagnosis of Indian visceral leishmaniasis: direct agglutination test versus rK39 strip test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**: 533-537.
- Terán-Angel G., Schallig H. D., Zerpa O., Rodríguez V., Ulrich M. & Cabrera M. (2007). Evaluation of the direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral *Leishmaniasis* in Venezuela. *Biomedica.* **27**: 447-453.
- Terán-Angel G., Rodríguez V., Silva R., Zerpa O., Schallig H., Ulrich M. et al. (2010). Herramientas no invasivas en el diagnóstico de leishmaniasis visceral en Venezuela: comparación entre pruebas inmunoserológicas: DAT, rK26, rK39. *Biomedica.* **30**: 39-45.
- Valenstein P. N. (1990). Evaluating diagnostic tests with imperfect standards. *Am. J. Clin. Pathol.* **93**: 252-258.
- Zerpa O., Ulrich M., Borges R., Rodríguez V., Centeno M., Negrón E., et al. (2003). Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Pan. Am. J. of Pub. Hlth.* **13**: 239-245.
- Zerpa O., Ulrich M., Benitez M., Avila C., Rodríguez V., Centeno M., et al. (2002). Epidemiological and Immunological Aspects of Human Visceral leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **97**: 1079-1083.
- Zijlstra E. E., Ali M. S., el-Hassan A. M., el-Toum I. A., Satti M., Ghalib H. W., et al. (1991). Direct agglutination test for diagnosis and sero-epidemiological survey of kala-azar in the Sudan. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**: 474-476.
- Zijlstra E. E., Ali M. S., el-Hassan A. M., el-Toum I. A., Satti M., Ghalib H. W., et al. (1992). Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **86**: 505-507.
- Zijlstra E. E., Daifalla N. S., Kager P. A., et al. (1998). RK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 717-720.
- Zulueta A. M., Villarroel E., Rodríguez N., Feliciangeli M. D., Mazzarri M., Reyes O., et al. (1999). Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 945-950.

Recibido el 30/03/2010  
Aceptado el 25/05/2010

