

EL ROL DE TRES PRUEBAS DE ELISA CON ANTIGENOS DE PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*, *L. AMAZONENSIS* Y *L. GUYANENSIS* EN EL DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA

JOSE F. GIL^{1,2,3}, CARLOS L. HOYOS¹, RUBEN O. CIMINO^{1,2}, ALEJANDRO J. KROLEWIECKI^{1,3}, INES LOPEZ QUIROGA², SILVANA P. CAJAL¹, MARISA JUAREZ¹, MARIA F. GARCIA BUSTOS³, MARIA C. MORA³, JORGE D. MARCO³, JULIO R. NASSER^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (IIET), Sede Regional Orán, ²Cátedra de Química Biológica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, ³Instituto de Patología Experimental (IPE-CONICET), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta

Resumen Es importante conocer si la variabilidad de especies de *Leishmania* circulantes en una región afecta la *performance* de las pruebas de ELISA estandarizadas para el diagnóstico de la leishmaniasis. El objetivo de este trabajo fue analizar la reactividad de la prueba de ELISA utilizando homogenados de promastigotes de *Leishmania (V.) braziliensis* (ELISAb), *L (L) amazonensis* (ELISAa) y *L (V.) guyanensis* (ELISAg) frente a distintos grupos de sueros. Se estudiaron muestras de personas con leishmaniasis cutánea (n = 37), leishmaniasis mucocutánea (n = 8), no infectados (n = 52), infectados por *Trypanosoma cruzi* (n = 11) e infecciones mixtas (n = 14). Se calcularon las sensibilidades, especificidades, *cut off*, valores predictivos, y se compararon las tres pruebas usando ANOVA, índice de concordancia kappa, comparación de curvas ROC e intervalos de confianza construidos por el método de *bootstrap*. Se encontraron diferencias significativas al comparar los niveles de DO de los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea respecto a los controles negativos, pero no se encontraron diferencias entre pruebas. Las sensibilidades calculadas fueron de 84.6% para ELISAb y ELISAa y de 88.5 para ELISAg, mientras que el valor de especificidad para las tres pruebas fue de 96.2. El índice de concordancia kappa y la comparación de curvas ROC mostraron *performances* similares para las tres pruebas (p = 0.225). La elevada reactividad obtenida para estas ELISAs frente a sueros de pacientes con leishmaniasis mucocutánea indica un importante potencial de esta técnica como complemento en el diagnóstico de la enfermedad.

Palabras clave: ELISA, leishmaniasis, diagnóstico

Abstract *Role of three ELISA tests using promastigote homogenates of Leishmania braziliensis, L. amazonensis and L. guyanensis in the diagnosis of tegumentary leishmaniasis.* It is important to know whether the variability of species of *Leishmania* parasites circulating in a region affects the performance of the ELISA test for the diagnosis of leishmaniasis. Therefore, the aim of this study was to analyze the reactivity of the ELISA using homogenates of promastigotes of *Leishmania (V.) braziliensis* (ELISAb), *Leishmania (L) amazonensis* (ELISAa) and *Leishmania (V.) guyanensis* (ELISAg) against different sera groups. Samples from individuals with cutaneous leishmaniasis (n = 37), mucocutaneous leishmaniasis (n = 8), healthy controls (n = 52), persons infected with *Trypanosoma cruzi* (n = 11) and mixed infections (n = 14) were included in the study. We calculated sensitivities, specificities, cut offs, and predictive values for the three tests and compared them using ANOVA, kappa index, ROC curves comparison, and confidence intervals calculated by the bootstrap method. Significant differences were found when comparing the OD levels of sera from patients with cutaneous leishmaniasis against healthy controls, but there were no differences when comparing the different ELISAs. The sensitivities calculated for ELISAb and ELISAa were 84.6 and of 88.5% for ELISAg, while the value of specificity for the three tests was 96.2. The kappa index (0.87) and comparison of ROC curves showed similar performance for the three ELISAs (p = 0.225). The high reactivity obtained for these ELISAs in sera of patients with mucocutaneous leishmaniasis indicates this test as an important complement in the diagnosis of the disease.

Key words: ELISA, leishmaniasis, diagnostic

La leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) es una enfermedad causada por protozoos flagelados del género *Leishmania* y transmitida en América por flebótomos del género *Lutzomyia*^{1, 2}. En la Argentina, el área endémica corresponde a nueve provincias localizadas en el norte y nordeste del país³. En particular, en el norte de la provincia de Salta, el espectro de manifestaciones clínicas endémicas incluye formas cutáneas simples, múltiples (LC), diseminada y mucocutánea (LMC), apareciendo esta última en un 7% de los casos⁴⁻⁶. Cabe resaltar que desde 1926 no se han notificado en esta provincia casos autóctonos de leishmaniasis visceral con patrón de transmisión endémica⁷. En muestras tomadas de pacientes y de perros en localidades pertenecientes a los departamentos San Martín, Anta y Orán, se han aislado parásitos de las especies *Leishmania (Viannia) braziliensis* y en menor frecuencia de *L. (V.) guyanensis*. Además, a partir de pacientes provenientes del departamento de Orán, se han aislado y caracterizado parásitos de *L. (L.) amazonensis*^{8-11, 12}.

En estas zonas, el diagnóstico de la LTA se realiza (alternativa o complementariamente) mediante la observación microscópica de amastigotes, cultivo, intradermoreacción de Montenegro (IRM) y en algunos casos a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{2, 10, 11, 13, 14}. Sin embargo, en ciertas circunstancias es muy difícil demostrar la presencia de parásitos en un frotis, la sensibilidad del cultivo es baja y la PCR no está disponible en la mayoría de los laboratorios en regiones donde la enfermedad es endémica¹⁵. De esta manera, métodos indirectos como los inmunoensayos y en particular las pruebas de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) pueden ser una alternativa complementaria valiosa para el diagnóstico de la LTA dado el bajo costo, la rapidez de los resultados, la elevada sensibilidad y la posibilidad de un procesamiento masivo de muestras¹⁶. Complementariamente, este hecho facilita la realización de estudios epidemiológicos a gran escala e incluso podría actuar como prueba de *screening*¹⁷.

Además, estas herramientas inmunoenzimáticas podrían ser usadas en el seguimiento serológico del tratamiento de la LTA, dado que se ha observado un descenso significativo en los niveles de anticuerpos después del tratamiento con quimioterapia o inmunoterapia en pacientes con LC¹⁸⁻²¹.

Por otro lado, se ha descrito la ocurrencia de casos asintomáticos de leishmaniasis, mostrando esto que la exposición al parásito de las personas que residen en áreas endémicas tiene una magnitud mayor a la dimensionada inicialmente²²⁻²⁴. Por ello, es importante resaltar que para realizar estudios de factores de riesgo se debería descartar la posibilidad de exposición al parásito (sujetos infectados asintomáticos) en las personas incluidas como controles negativos. Además, es importante conocer el riesgo y la frecuencia de aparición de formas mucocutá-

neas en personas que no evidencian la puerta de entrada del parásito (lesiones o cicatrices)²².

Sumado a esto, la respuesta humoral que desarrolla un huésped determinado infectado con parásitos de leishmania ha mostrado en algunos casos diferencias en función de la especie infectante^{25, 26}, lo que limitaría el uso de un determinado antígeno en zonas donde circulan distintas especies, ya que se correría el riesgo de subestimar la magnitud del problema²⁷. Sin embargo, estas diferencias pueden estar determinadas por un restringido mosaico antigénico, siendo poco conocido dicho comportamiento con antígenos totales.

Diferentes estudios han encontrado valores de sensibilidad y especificidad dispares en las pruebas serológicas desarrolladas, limitando de este modo su uso^{2, 16, 28}. Por todo esto, el objetivo del presente trabajo fue analizar la reactividad de la prueba de ELISA utilizando homogenados proteicos de promastigotes de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) guyanensis* frente a inmunoglobulinas G (IgG) de sueros de pacientes con leishmaniasis tegumentaria del norte de la Argentina.

Materiales y métodos

Las muestras provienen de dos localidades de la provincia de Salta, ubicada en el norte de la Argentina (Fig. 1). Se analizaron un total de 122 sueros colectados en el Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (IIET; n = 59) y la Cátedra de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Naturales (n = 63), ambos de la Universidad Nacional de Salta (UNSa). Este trabajo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNSa. Los grupos de sueros están conformados como se describe a continuación. LC: 37 sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea; LMC: sueros de 8 pacientes con leishmaniasis mucocutánea. Estos pacientes fueron positivos por métodos parasitológicos



Fig. 1.— Ubicación de las localidades de la provincia de Salta de las que provienen las muestras de sueros de pacientes con leishmaniasis, infecciones mixtas *Trypanosoma cruzi-Leishmania sp.* (Orán), con infección por *T. cruzi*, y controles negativos (Salta-Capital).

que incluyen la observación de amastigotes en extendidos de raspado de la lesión teñidos con Giemsa y la observación de promastigotes en cultivos realizados en medio NNN (Medio de Novy, McNeal, Nicolle) a partir de aspirado de lesiones. También fueron reactivos por IRM¹¹, considerados como positivos por la generación de una induración ≥ 5 mm de diámetro, y el lote de leishmanina usado fue producido en el ILET⁷; IM: catorce sueros de pacientes con infección mixta por *Leishmania* sp. y *T. cruzi*, definidos como tales por los métodos de diagnóstico de leishmaniasis descriptos más arriba y sero-reativos para el kit comercial recombinante 3.0 de Wiener labs (especificidad del 100%)²⁹; CN: 52 controles negativos sin historia de LTA ni infección por *Trypanosoma cruzi*, provenientes de la capital de Salta (zona libre de transmisión de leishmaniasis). Todas estas muestras fueron no reactivas frente a pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de Chagas (Hemoaglutinación Indirecta: HAI; y ELISA) y Ch: once muestras de sueros de pacientes con infección por *Trypanosoma cruzi* diagnosticados mediante serología convencional (HAI y ELISA) provenientes de Salta – Capital.

Se desarrollaron inicialmente en un medio de cultivo bifásico (Usmaru modificado), formas promastigotes de *L. (V) braziliensis* (MHOM/BR/84/LTB-300), *L. (L) amazonensis* (MHOM/VE/84/MEL) y *L. (V) guyanensis* (MHOM/AR/98/JDM1)⁸. Este medio consiste en una fase sólida de agar base sangre, con 15% de sangre de conejo desfibrinada y hemolizada, y solución salina glucosada al 1% como fase líquida³⁰. Luego, para la obtención del cultivo masivo, se transfirieron los parásitos a un medio líquido (RPMI 1640 con bicarbonato de sodio, L-glutamina, suero bovino fetal al 10 o 20% y penicilina - estreptomycin). Una vez obtenidos 50 ml de un cultivo bien desarrollado, los parásitos (promastigotes en fase estacionaria) fueron concentrados por centrifugación a 5 000 rpm durante 10 minutos y lavados tres veces (1 500 xg por 20 minutos) con PBS-BSA (buffer fosfato salino – albúmina de suero bovino). El *pellet* de parásitos fue sometido a lisis usando un *buffer* de lisis (Tris base 50 mM pH = 8, EDTA 1mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y triton x100 0.1%) diluido con solución de sacarosa. Este lisado fue centrifugado a 20 000g por 60 minutos a 4 °C obteniéndose la fracción soluble de proteínas en el sobrenadante, el cual fue cuantificado por medio del método de Bradford y conservado a -20 °C hasta su uso³¹.

Antes de procesar las muestras correspondientes al estudio, se evaluaron los *buffer* carbonato (pH = 9.6) y *buffer* fosfato salino (PBS, pH = 7.2) como disolventes para la adhesión de los antígenos a las placas (sensibilización) y se realizó una titulación con tres diluciones de suero (1:20; 1:40; 1:80) y dos diluciones (1:10 000 y 1:20 000) de anti-IgG conjugada con peroxidasa a los fines de obtener valores de densidad óptica (DO) apropiados. Este procedimiento de titulación permite reducir el efecto de *background* y lograr una mejor discriminación entre los sueros controles negativos y positivos.

Luego de la elección de concentraciones y *buffers*, se aplicaron las técnicas de ELISA usando independientemente como antígeno sensibilizante de placas, 2µg/100µl/pocillo de homogenado proteico de promastigotes de *L. (V) braziliensis* (ELISAb), *L. (L) amazonensis* (ELISAa) y *L. (V) guyanensis* (ELISAg) diluidos en PBS, e incubados toda la noche a 4 °C. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con PBS-leche descremada al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, y previo lavado con PBS-*Tween* al 0.1%, se agregaron los sueros en una dilución 1:40 en PBS-leche al 1% con una hora de incubación. Cumplido ese tiempo se lavaron las placas cuidadosamente con el mismo *buffer* de lavado y se agregó el conjugado diluido 1:10 000 en PBS-*Tween* 0.05%. El tiempo de reacción del conjugado fue de una hora a temperatura ambiente, lavándose la placa al concluir el tiempo de aplicación con PBS-*Tween* al 0.1%. La reacción fue

visualizada agregando dihidrocloruro de orto-fenilendiamina y H₂O₂ al 30%, diluidos en *buffer* citrato (pH = 5.3). Se dejó reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, deteniéndose la reacción con ácido sulfúrico 2M. Todos los sueros fueron analizados por duplicado y los valores de DO fueron determinados mediante un lector de ELISA METRO-LAB-980 a 490 nm³². El *cut off* fue seleccionado mediante el análisis de curvas ROC (*Receiver Operator Characteristic*) y las zonas de indeterminación fueron calculadas como el $\pm 10\%$ de dichas líneas de corte²¹.

Los valores medios de DO resultantes del procesamiento de 26 sueros de pacientes con LC y 26 sueros controles negativos, frente a las diferentes pruebas de ELISA (ELISAb; ELISAa; ELISAg), fueron comparados mediante un ANOVA (análisis de la varianza) a dos criterios de clasificación, usándose como post-test la prueba de Bonferroni. Utilizando las DO de esos mismos sueros y a través del análisis de curvas ROC, se evaluó la *performance* de cada prueba de ELISA y se eligió el *cut off* que generó la mayor sensibilidad y especificidad de cada una de ellas³³. Luego se procesaron simultáneamente y con un mismo stock de reactivos todos los grupos de sueros, a los fines de comparar las medias de DO mediante la metodología no paramétrica *bootstrap* de construcción de intervalos de confianza (IC) del *software Infostat profesional 1.0* (<http://www.infostat.com.ar>)³⁴. Cabe recalcar que para esta etapa se usaron 11 sueros de pacientes con LC y 26 sueros de CN no incluidos en los análisis previos, como se muestra en el esquema de la Fig. 2. El índice de concordancia kappa y los valores predictivos positivos y negativos (para una prevalencia del 5%)³⁵ para cada prueba de ELISA fueron calculados utilizando el software EPIDAT 3.1 (<http://dxsp.sergas.es>).

Resultados

Los resultados del ANOVA a dos criterios de clasificación, al comparar las densidades ópticas (DO) obtenidas para los sueros controles negativos y de pacientes con leishmaniasis, frente a ELISAb, ELISAa y ELISAg, evidenciaron que no existen diferencias significativas entre las distintas pruebas serológicas ($p > 0.5223$) pero sí entre los resultados de los controles positivos y negativos ($p < 0.0001$). De este modo, se puede observar que los niveles medios de DO son bajos en los sueros de personas “sin infección” (ELISAb = 0.2; ELISAa = 0.2; ELISAg = 0.1) y no muestran diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas, hecho señalado por el resultado del postest de Bonferroni (ELISAb vs ELISAa, $p = 0.374$; ELISAb vs ELISAg, $p = 0.062$, ELISAa vs ELISAg, $p = 0.109$). Para este grupo de sueros se evidenció también una mayor dispersión para ELISAb respecto a las demás ELISAs (Fig. 3). Por otro lado, los promedios de las DO de los sueros de pacientes con leishmaniasis (ELISAb = 1.1; ELISAa = 0.9; ELISAg = 1.1) tampoco mostraron, entre ellos, diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las tres ELISA (ELISAb vs ELISAa, $p = 0.056$; ELISAb vs ELISAg, $p = 0.360$, ELISAa vs. ELISAg, $p = 0.062$).

Además, se observó que las áreas bajo las curvas ROC de cada una de las pruebas tuvieron valores superiores a 0.9, con una muy buena *performance* para todas ellas.

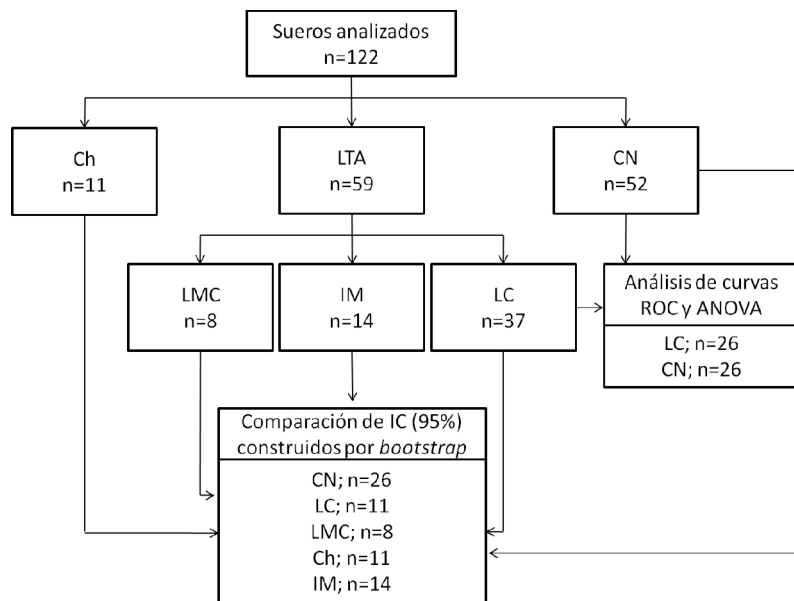


Fig. 2.- Muestra los distintos grupos de sueros procesados así como el tipo de análisis estadístico en el que fueron incluidos. LTA: incluye los sueros de pacientes con LC, LMC. IM: sueros de pacientes con LC y con infección por *T. cruzi*. IC: Intervalos de Confianza.

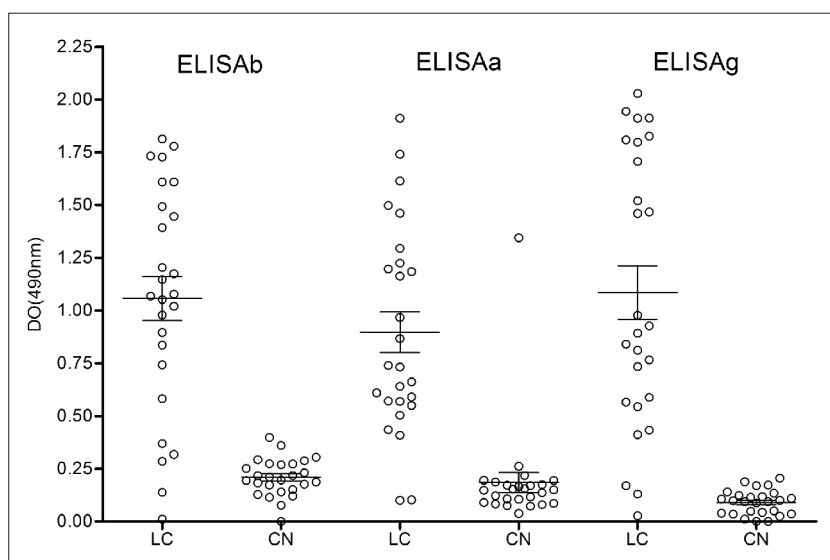


Fig. 3.- Reactividad de los sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea (LC) y de los controles negativos (CN) frente a las tres pruebas de ELISA.

Cuando se compararon dichas áreas ROC, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.225$) mostrando un patrón gráfico similar (Tabla 1 y Fig. 4).

Los valores máximos de sensibilidad y especificidad determinados son similares para las tres pruebas y están dados por un *cut off* de 0.36, 0.46 y 0.19 de DO para ELISAb, ELISAa y ELISAg respectivamente (Tabla1).

Las frecuencias de positividad y negatividad usando estos *cut off* son mostradas en la Tabla 2.

Los valores predictivos positivos no superaron el 55% para ninguno de las tres pruebas, siendo similares en todos los casos, mientras que los valores predictivos negativos fueron elevados, con magnitudes aproximadas del 99%.

TABLA 1.— Muestra los parámetros de evaluación de performance de las tres pruebas de ELISA. El área bajo de la curva ROC, el cut off que genera la mayor sensibilidad y especificidad de las pruebas, las sensibilidades y especificidades calculadas, los valores predictivos (positivos: VPP; negativos: VPN para una prevalencia del 5%), el valor de probabilidad asociado a la comparación de las curvas ROC y el valor del índice de concordancia kappa

	ELISAb	ELISAA	ELISAg
ABC	0.92	0.91	0.95
(IC 95%)	(0.82-1.00)	(0.82-1.00)	(0.88-1.00)
Cut off (DO)	0.36	0.46	0.19
Sensibilidad	84.62	84.62	88.46
(IC 95%)	(65.13-95.64)	(65.13-95.64)	(69.85-97.55)
Especificidad	96.15	96.15	96.15
(IC 95%)	(80.36-99.90)	(80.36-99.90)	(80.36-99.90)
VPP	53.64	53.57	54.74
VPN	99.17	99.17	99.65
Comparación de curvas ROC		p = 0.225	
Índice kappa		0.87	
(IC 95%)		(0.75-0.98)	

ABC: Área bajo de la curva. IC: Intervalo de confianza, DO: Densidad óptica

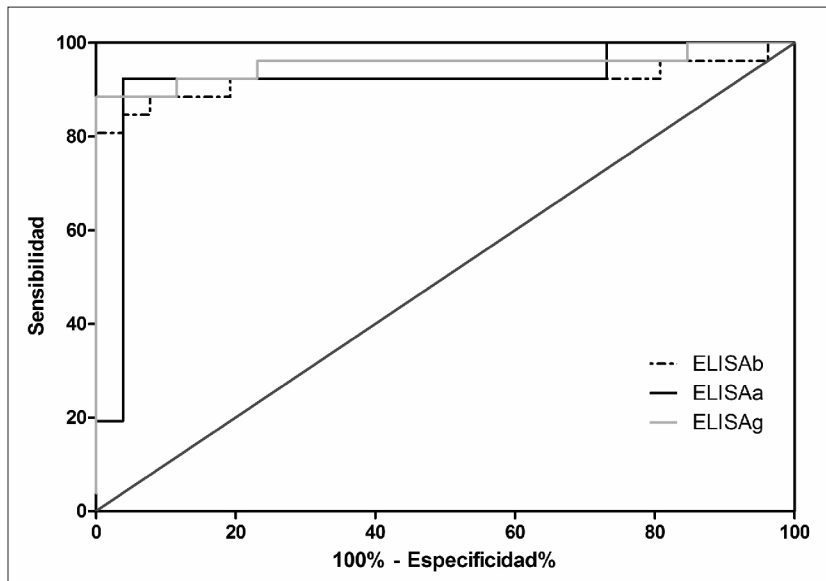


Fig. 4.— Gráfico de comparación de curvas ROC para ELISAb, ELISAA y ELISAg.

El índice de concordancia kappa calculado para la reactividad de las tres técnicas de ELISA fue del 0.87% (IC: 0.75-0.98) revelando un importante acuerdo de los resultados para estas tres técnicas, más allá del azar (Tabla 1).

Al analizar los sueros de pacientes con LMC se observaron niveles elevados de IgG, y aunque no mostraron en promedio diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo LC (Tabla 3), todos ellos resultaron

reactivos para ELISAb. Sin embargo, cuando se analizaron estos sueros con ELISAA, seis de ellos resultaron positivos y dos indeterminados, mientras que para ELISAg se encontraron 7 positivos y uno negativo.

Los sueros de pacientes con infecciones mixtas (IM) presentaron también niveles muy elevados de IgG respecto de los demás grupos, aunque sin diferencias significativas ($p > 0.05$; Tabla 3).

TABLA 2.— Muestra los resultados de positividad y negatividad de los sueros con LC y los controles negativos para las tres pruebas de ELISA al utilizar los cut off respectivos que generan las mayores sensibilidades y especificidades.

		Frotis e IRM		total
		+	-	
ELISAb	+	22	1	23
	-	4	25	29
	total	26	26	52
ELISAa	+	22	1	23
	-	4	25	29
	total	26	26	52
ELISAg	+	23	1	24
	-	3	25	28
	total	26	26	52

IRM: Intrademorreacción de Montenegro.

Finalmente, los resultados obtenidos para las muestras correspondientes a CH son similares a la de pacientes con LC y LMC ($p > 0.05$), y las pruebas evidenciaron reacción positiva para 13 (uno indeterminado), 14 y 13 (uno negativo) sueros frente a ELISAb, ELISAa y ELISAg respectivamente.

Discusión

El norte de la provincia de Salta presenta zonas con magnitudes hiperendémicas de transmisión de la LTA²⁴. Los parásitos aislados de pacientes de esta región en particular fueron caracterizados como *L. (V) braziliensis*, *L. (L) amazonensis* y *L. (V) guyanensis* y si bien se podría esperar que diferentes especies de *Leishmania* generen diferentes patrones de reactividad frente a una misma prueba inmunoenzimática, en el presente trabajo se han encontrado *performances* muy similares en las tres ELISAs estudiadas, y las sensibilidades de

las mismas fueron de elevada magnitud en todos los casos (superiores al 80%, Tabla 1)³⁶.

En estudios previos se observaron, usando antígenos de promastigotes de *L. (V) braziliensis*, sensibilidades del 85.41% (73.27-93.29), 85%, 93% y 89.3% (72.8-96.3)^{16, 28 37, 38}. Por otro lado, mediante ELISAs usando antígenos de *L. (L) infantum* y *L. (L) mexicana* frente a sueros de pacientes con LC, se encontraron sensibilidades del 78 (64.8-91) y 92.3%, respectivamente^{39, 40}. Como puede verse, todos estos valores son similares a los que hemos encontrado en el presente estudio. Cabe resaltar que la ausencia de diferencias entre los niveles de reactividad de ELISAs usando antígenos de *L. (V) braziliensis* y *L. (L) amazonensis* ya ha sido señalada antes²¹. Sin embargo, no existen informes previos de la comparación de antígenos de las tres especies incluidas en este estudio.

Por otro lado, el hecho de que la sensibilidad no sea más elevada, podría estar relacionado al tiempo de infección transcurrido desde la ocurrencia de la infección en los pacientes y el momento de la toma de muestra. Esto se desprende de las evidencias de la existencia de correlación positiva entre valores de DO respecto al tiempo de infección transcurrido^{25, 41, 42}. De este modo, pacientes con una infección aguda de pocos días de desarrollo podrían no ser detectados, motivo por el cual estos factores deberían tenerse en cuenta en el procesamiento de las muestras.

Estas pruebas también podrían representar una herramienta importante en el seguimiento del tratamiento y de nuevos ensayos clínicos, ya que se ha observado previamente que los niveles de anticuerpos descienden luego de la intervención terapéutica en pacientes con LC^{36, 43-45}.

Por otro lado, en el norte de Salta existe un subregistro de casos debido a la difícil accesibilidad a algunos pequeños parajes. Ejemplo de ello son los parajes de Media Luna y el Tremental donde, durante el año 2010, personal del Hospital San Vicente de Paul realizando búsqueda activa (y cuyo diagnóstico fue realizado mediante frotis en el IJET), ha encontrado casos de LMC no

TABLA 3.— Tamaños muestrales, promedios e intervalos de confianza (IC) no paramétricos estimados por bootstrap de las DO para todos los grupos de sueros, con un nivel de confianza del 95%

Grupos de sueros	ELISAb		ELISAa		ELISAg	
	Media de DO	(IC 95%)	Media de DO	(IC 95%)	Media de DO	(IC 95%)
CN (n=26)	0.21	(0.17 - 0.24)	0.18	(0.12 - 0.28)	0.10	(0.07 - 0.12)
LC (n=11)	1.07	(0.74 - 1.44)	0.92	(0.59 - 1.25)	0.76	(0.38 - 1.16)
LMC (n=8)	1.35	(0.93 - 1.70)	1.34	(0.91 - 1.72)	1.24	(0.75 - 1.61)
Ch (n=11)	1.36	(1.00 - 1.71)	1.49	(1.04 - 1.87)	1.10	(0.66 - 1.44)
IM (n=14)	1.59	(1.30 - 1.81)	1.72	(1.48 - 1.93)	1.45	(1.20 - 1.69)

CN: sueros de individuos no infectados o controles negativos. LC: sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea. LMC: sueros de pacientes con leishmaniasis mucocutánea. Ch: sueros de pacientes seropositivos para *T. cruzi*. IM: sueros de pacientes con infección mixta *Leishmania* sp-T. cruzi.

detectados previamente por el sistema de salud (datos no publicados) algunos de los cuales no mostraban señales de primoinfección cutánea. Sumado a esto, en algunos sitios rurales donde esta enfermedad se transmite, no se cuenta con infraestructura ni personal capacitado para el diagnóstico parasitológico de la LMC. Dado que todos los sueros de pacientes con LMC analizados aquí resultaron positivos para ELISAb, puede decirse que la sensibilidad de nuestras pruebas inmunológicas es mayor frente a pacientes con LMC, hecho que ha sido observado también por otros autores^{21, 46, 47} siendo evidente la utilidad de estas técnicas. Hay que considerar también el hecho de que con un *cut off* de 0.490 para ELISAb se puede obtener una especificidad del 100% y una sensibilidad de 80.8%, determinando que una muestra de suero que evidencie reactividad (descartándose por otros métodos reacción cruzada con *T. cruzi*), puede ser considerada como positiva para la infección por *Leishmania* sp.

Se ha informado también de la persistencia de *L. (V) braziliensis* en pacientes con determinadas características inmunológicas y genéticas⁴⁸, así como en cicatrices de pacientes con LTA que habían curado clínicamente luego del tratamiento con antimoniales once años antes⁴⁹. Además, han existido previas notificaciones sobre la existencia de casos subclínicos en el departamento de Orán, fenómeno que genera la inquietud de cuál es la importancia de éstos en la aparición posterior de formas graves de la enfermedad, ya que al pasar desapercibidos no reciben tratamiento^{23, 24}. Este tipo de casos pueden ser detectados y monitoreados mediante inmunoensayos^{46, 48}.

Sumado a esto, en los últimos años la trasmisión de esta enfermedad ha sufrido un proceso de urbanización llegando a afectar los barrios periféricos de algunas ciudades^{50, 51}. Esto plantea la existencia de un posible cambio en los patrones epidemiológicos de la enfermedad y la necesidad de nuevos estudios de determinantes de la salud. Aquí, nuestras pruebas de ELISA pueden ser una herramienta fundamental para no incluir personas con infección subclínica como controles negativos evitando así la distorsión de los resultados, lo que está respaldado por los valores predictivos negativos superiores al 99%, obtenidos para estas pruebas.

La especificidad de estas pruebas es elevada cuando no se incluyen sueros de pacientes infectados por *T. cruzi* similares a las encontradas en otros estudios: 89.59% (79.41-96.08), 95.4%, 96.9% (89.5-99.2)^{28, 37, 38}. En general, la cruzada de reacción con sueros de pacientes con infección por *T. cruzi* es cercana al 100%, aunque en un trabajo en el que se usó una fracción de antígenos de *L. (V) braziliensis* consiguieron disminuir la inespecificidad a un 16.7% logrando una especificidad global del 91.2%²⁸. Incluso para un valor como este último, para estudios a campo se deberá descartar la infección por *T. cruzi* usando pruebas específicas para la enfermedad de Chagas

o pruebas secuenciales específicas para leishmaniasis sobre las muestras que den resultados positivos^{34, 52}.

El presente trabajo es el primer reporte de la comparación de patrones de reactividad de sueros de paciente con LC, LMC, IM y Ch frente a la pruebas de ELISA usando antígenos de promastigotes de las especies de *Leishmania* que circulan en el norte de Argentina. Teniendo en cuenta los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos, estas pruebas de ELISA podrían representar un complemento a los métodos diagnósticos convencionales, principalmente para la LMC, ya que con ellas podría mejorarse importantemente la sensibilidad global de la detección de la infección si se utilizan como prueba diagnóstica paralela, esto sobre todo en zonas donde no se encuentre infección por *T. cruzi* o la prevalencia de esta última sea baja.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Facultad de Ciencias de la Salud y del Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Salta (CIUNSA). Se agradece a *Wiener labs* por la donación de los *kits* de ELISA y HAI.

Conflictos de interés: No existen conflictos de interés financieros o personales.

Bibliografía

1. Grimaldi G, Jr., Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 230-50.
2. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 581-96.
3. Salomon OD, Orellano PW, Quintana MG, et al. Transmisión de la leishmaniasis tegumentaria en Argentina. *Medicina (B Aires)* 2006; 66: 211-9.
4. Krolewiecki A, Cajal P, Juárez M, et al. Análisis clínico epidemiológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana en Orán, Salta. III Simposio Internacional de Epidemiología y II Encuentro Nacional de Epidemiólogos de Campo. Buenos Aires, Argentina 2007; *Abstract* N° 16.
5. Gil J, Cajal S, Acosta N, et al. Descripción epidemiológica de la leishmaniasis en el norte de la provincia de Salta. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis VI Congreso Argentino de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina 2008; *Abstract* N° 20.
6. Hashiguchi Y, Gomez E, Uezato H, et al. Comparison of diffuse (DCL) and disseminated (DSCL) cutaneous Leishmaniasis: an overview of cases observed in Ecuador, and a brief comment. Hashiguchi Y, ed. *Studies on New World Leishmaniasis and its Transmission, with Particular Reference to Ecuador, Peru, Argentina and Pakistan. Research Report Series* No. 8. Kochi, Japan: Kyowa Printing, 2008.
7. Salomón OD, Sosa Estani S, Rossi GC, Spinelli GR. Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniasis visceral en Argentina. *Medicina (B Aires)* 2001; 61: 174-8.
8. Krolewiecki AJ, Romero HD, Cajal SP, et al. A randomized clinical trial comparing oral azithromycin and meglumine antimoniate for the treatment of American cutaneous

- leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 640-6.
9. Marco JD, Uezato H, Mimori T, et al. Are cytochrome B gene sequencing and polymorphism-specific polymerase chain reaction as reliable as multilocus enzyme electrophoresis for identifying *Leishmania* spp. from Argentina? *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75: 256-60.
 10. Marco JD, Barroso PA, Calvopina M, et al. Species assignment of *Leishmania* from human and canine American tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in North Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 72: 606-11.
 11. Frank FM, Fernandez MM, Taranto NJ, et al. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology* 2003; 126: 31-9.
 12. Barrio A, Garcia Bustos M, Mora M, et al. Identification by PS-PCR of *Leishmania* species and its correlation with clinical, epidemiologic, and therapeutic characteristics in Salta, Argentina. *Revista Argentina de Salud Pública* 2009; 1: 30-3.
 13. Barrio A, Mora MC, Ramos F, Moreno S, Samson R, Basombrio MA. Use of kDNA-based polymerase chain reaction as a sensitive and differentially diagnostic method of American Tegumentary Leishmaniasis in disease-endemic areas of northern Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 77: 636-9.
 14. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 21-5.
 15. Zeyrek FY, Korkmaz M, Ozbek Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1409-15.
 16. Ferreira MP, Roselino AM, Nascimento MM, Aires JM, Figueiredo JF. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. brasiliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48:215-7.
 17. Taranto NJ, Cajal SP, De Marzi MC, et al. Clinical status and parasitic infection in a Wichi Aboriginal community in Salta, Argentina. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003; 97: 554-8.
 18. Tapia FJ, Castes M. Inmunología de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. En: www.biomedicina.org.ve/publicaciones, 1998; consultado el 15-01-2011.
 19. Pereyra V, Gil J, Cimino R, et al. Serología de pacientes con Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) tratados con dihidrato de Azitromicina (AZTM) y Antimonio de N-Metil-glucamina (Sbv) que evidenciaron cura clínica. XXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. Chascomús, Buenos Aires, Argentina 1998; *Abstract N° IN-16*.
 20. Marco J, Korenaga M, Barroso P, et al. Immunoglobulins isotopes and IgG subclasses as molecular markers of efficacy of pentavalent antimonials treatment of American tegumentary leishmaniasis. 63rd Annual Meeting of the Japanese Society of Parasitology - Western region Kochi, Japan 2007; *Abstract N° 22*.
 21. Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VM, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 47: 477-85.
 22. Fagundes A, Marzochi MC, Fernandes O, et al. First encounter of subclinical human *Leishmania (Viannia) infection* in State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 1003-5.
 23. Sosa-Estani S, Segura EL, Salomon OD, et al. Tegumentary leishmaniasis in Northern Argentina: distribution of infection and disease, in three municipalities of Salta, 1990-1992. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33: 573-82.
 24. Salomon OD, Sosa Estani S, Canini L, Córdoba Lanús E. Leishmaniasis tegumentaria en un área con niveles epidémicos de transmisión, Salta, Argentina 1998. *Medicina (B Aires)* 2001; 61: 284-90.
 25. Garcez LM, Silveira FT, el Harith A, Lainson R, Shaw JJ. Experimental cutaneous leishmaniasis. IV. The humoral response of *Cebus apella* (Primates: Cebidae) to infections of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) lainsoni* and *L. (V.) braziliensis* using the direct agglutination test. *Acta Trop* 1997; 68: 65-76.
 26. Romero GA, de la Glória Orge Orge M, de Farias Guerra MV, et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop* 2005; 93: 49-56.
 27. Ribeiro FC, Schubach AdO, Mouta-Confort E, Schubach TMP, Madeira MdF, Marzochi MCA. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Vet Parasitology* 2007; 148: 200-6.
 28. Vidigal C de P, Marcussi VM, Marcussi LM, et al. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2008; 107: 208-12.
 29. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1045-9.
 30. Evans D. Handbook on Isolation, Characterization, and Cryopreservation of *Leishmania*. Editor: WHO. Geneva, 1989; pp. 1-45.
 31. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitative analysis of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *An Biochem* 1976: 248-54.
 32. Cimino R, Monje Rumi M, Ragone P, et al. Immunoenzymatic evaluation of the recombinant TSSA-II protein of *Trypanosoma cruzi* in dogs and human sera: A tool for epidemiologic studies. *Parasitology* 2011; 26:1-8.
 33. Krolewiecki AJ, Ramanathan R, Fink V, et al. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 1624-30.
 34. Gil J, Cimino R, López Quiroga I, et al. Reactividad del antígeno GST-SAPA de *Trypanosoma cruzi* frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y Leishmania. *Medicina (B Aires)* 2011; 71: 113-19.
 35. Taranto NJ. Patologías endémicas. En: Rubinski RO, Voyer LE y Cambiano CT, eds. *Pediatría*. Buenos Aires. Ediciones Journal 2003. p 530-41.
 36. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8: 419-33.
 37. Yoneyama KA, de Peder LD, Lonardon MV, Silveira TG. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Parana State, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2007; 11: 360-4.
 38. Guimarães MC, Celeste BJ, Franco EL. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay for mucocutaneous

- leishmaniasis and comparison with microplate enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 364-7.
39. Zeyrek FY, Korkmaz M, Ozbel Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1409-15.
 40. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1037-43.
 41. Convit J, Pinardi ME. Applying the indirect immunofluorescence test to the study of American cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Int* 1969; 8: 17-20.
 42. Menzel S, Bienzle U. Antibody responses in patients with cutaneous leishmaniasis of the Old World. *Tropenmed Parasitol* 1978; 29: 194-7.
 43. Walton BC. Evaluation of chemotherapy of American leishmaniasis by the indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29: 747-52.
 44. Mendonca SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 347-55.
 45. Gomes Casavechia M, Gomes Verzignassi Silveira T, Teodoro U, Janeiro V, Udo M, Valdrinez Campana Lonnardoni M. Variables associated with the post-treatment healing of lesions in patients with American cutaneous leishmaniasis in Paraná State, Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 45: 841-7.
 46. Amorim AG, Carrington M, Miles MA, Barker DC, de Almeida ML. Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. *Cell Stress Chaperones* 1996; 1: 177-87.
 47. Vexenat Ade C, Santana JM, Teixeira AR. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996; 38: 177-85.
 48. Ramirez JL, Guevara P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 333-8.
 49. Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 824-7.
 50. Gil JF, Nasser JR, Cajal SP, et al. Urban transmission of American cutaneous leishmaniasis in Argentina: spatial analysis study. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82: 433-40.
 51. Hoyos C, Cajal S, Acosta N, et al. Epidemiología de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana en Hipólito Yrigoyen, Dpto. Orán. Salta. XXIV Reunión Científica Anual Sociedad Argentina de Protozoología. Ascochinga, Córdoba, Argentina 2010; Abstract N° EyV19.
 52. Chiamonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Heredia V, Taranto NJ, Malchiodi EL. Estudio de casos de leishmaniasis en la provincia de Salta. Evidencias de infección mixta por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. *Medicina (B Aires)* 1996; 56: 259-68.

LA TAPA

**Marta Edith Yajnes. Hipérico (Hierba de San Juan, *St. John's wort*).
Hypericum perforatum L.**

Fotografía tomada con equipo Sony DSC-H1 el 10 de enero del 2008 a las 16 h, en San Carlos de Bariloche.

Marta Edith Yajnes es arquitecta e investigadora del CEP ATAE de la Facultad de Arquitectura, Diseño y Urbanismo de la Universidad de Buenos Aires. Participa con sus fotografías en el sitio www.fotonaturaleza.org (Comunidad Argentina de Fotógrafos de Naturaleza).

***Hypericum perforatum* L.** (hipérico, hipericón, corazoncillo o Hierba de San Juan; en inglés: *St John's wort*), arbusto que crece como una maleza invasora, originario de Europa y aclimatado en Asia, África, Oceanía y América. Es una de las más viejas hierbas medicinales. Recomendada con aplicaciones múltiples por Hipócrates, Dioscórides y la sabiduría popular. La aplicación médica que ha concitado el mayor interés es como tratamiento de la depresión. Se administra en la forma de extractos estandarizados, tinturas, grageas, cápsulas o bolsitas para infusiones. Se utilizan, por su mayor concentración en principios activos, pimpollos, flores y puntas de los brotes. Los componentes bioactivos principales son la hipericina y la hiperforina. El mecanismo de acción no está claro, tal vez varios de los componentes del hipérico contribuyan sinérgicamente a los efectos clínicos (Linde K. *St. John's Wort – an Overview. Forsch Komplementmed* 2009; 16: 146-55). El hipérico se ha utilizado incluso para tratar la depresión mayor con buenos resultados (*St John's wort for major depression*. Linde K, Berner MM, Kriston L. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008 Oct 8;(4):CD000448. Comentado en: Review: *St John's wort superior to placebo and similar to antidepressants for major depression but with fewer side effects. Evid Based Mental Health* 2009; 12: 78). Otros meta-analistas proponen cautelosas conclusiones y recomiendan futuros estudios (Freeman MP, Fava M, Lake J, Trivedi MH, Wisner KL, Mischoulon D. Complementary and alternative medicine in major depressive disorder: The American Psychiatric Association Task Force report. *J Clin Psychiatry*. 2010; 71: 669-81).