

26) 23

RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO DE LA INMUNOFLUORESCENCIA Y EL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO EN SUEROS DE PACIENTES CON LEISHMANIASIS DEL NORTE Y EL NORDESTE DE BRASIL¹

— M. C. S. Guimarães², B. J. Celeste³ y E. L. Franco⁴ —

Se examinó un total de 341 muestras de suero para detectar anticuerpos IgA, IgG e IgM anti-Leishmania mediante pruebas de inmunofluorescencia (IF) y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). En conjunto, 292 de los sueros pertenecían a pacientes con diagnósticos clínicos y parasitológicos de leishmaniasis cutánea (resultados positivos en la impronta de lesiones o en la prueba cutánea de Montenegro) y 49, a controles de la misma población. Los índices de rendimiento diagnóstico de los ELISA-IgG e IgM fueron de utilidad diagnóstica y el valor predictivo positivo del ELISA-IgG fue de 94,6%. La especificidad de la prueba de IF-IgA fue notablemente alta (100%), pero su sensibilidad fue muy baja.

La leishmaniasis es endémica en América Latina, desde el norte de México y el sur de Texas hasta el norte de la Argentina. En el Brasil, la enfermedad se presenta principalmente en las regiones del norte y el nordeste del país. Durante el periodo comprendido entre 1979 y 1985, se detectaron 40 985 casos en el Brasil y, solo en 1985, se notificó un total de 11 508 casos (1, 2). Los complejos *Leishmania mexicana* y *L. braziliensis* se en-

cuentran en las áreas endémicas del Brasil y solo causan generalmente leishmaniasis cutánea (LC). No obstante, si la enfermedad no se trata, la mucosa bucofaringea de los pacientes infectados por *L. b. braziliensis* puede ser invadida y destruida. Las especies *Leishmania* se pueden identificar mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (3), métodos isoenzimáticos (4) o sondas de ADN (5); no obstante, estas pruebas todavía no se han estandarizado. En el trabajo sobre el terreno o en el diagnóstico de rutina de pacientes hospitalizados o ambulatorios, la leishmaniasis mucocutánea (LMC) se diagnostica mediante la impronta de lesiones (6) o con pruebas cutáneas de respuesta retardada (7). Para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis, también se han elaborado técnicas con

¹ Publicado en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 68, No 1, 1990, con el título "Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil" © Organización Mundial de la Salud, 1990

² Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratorio de Seroepidemiología. Dirección postal: Avda. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 470, 05403, São Paulo, Brasil. Las solicitudes de separatas deben dirigirse a esta dirección.

³ Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratorio de Seroepidemiología, São Paulo, Brasil.

⁴ Instituto Armand Frappier, Centro de Investigaciones en Epidemiología y Medicina Preventiva, Laval, Quebec, Canadá.

anticuerpos marcados, tales como la prueba de inmunofluorescencia (IF) (8) y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) que emplean antígenos solubles (9, 10) o en partículas (Dot-ELISA) (11).

Los índices del rendimiento diagnóstico de la IF y del ELISA se han estimado recientemente en un grupo de pacientes de leishmaniasis que presentaban síntomas de larga duración o graves y en controles sin ningún contacto previo con el agente etiológico (12). A pesar de ser muy útiles para la estandarización de las pruebas, esas estimaciones no reflejan el patrón epidemiológico de la enfermedad encontrado en las zonas endémicas.

En este estudio, se examinaron 341 sueros pertenecientes a 292 pacientes con LC y a 49 controles, habitantes de zonas endémicas del Brasil, para investigar la presencia de anticuerpos IgG, IgA e IgM anti-*Leishmania* mediante la IF y el ELISA. Posteriormente, se calcularon los índices de rendimiento diagnóstico sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y la eficacia, con el propósito de determinar si estas pruebas serológicas podrían emplearse para el diagnóstico de las leishmaniasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sueros

Se reunió un total de 341 muestras de suero en las oficinas regionales de la Superintendencia de Campañas de Salud Pública del Ministerio de Salud del Brasil (SUCAM), en el norte y el nordeste del país. Para efectuar el diagnóstico de LC, se usaron la impronta de lesiones (6) y la prueba cutánea de Montenegro (7). También se exami-

naron 13 sueros de pacientes con diagnóstico clínico de LMC, pero los resultados obtenidos se utilizaron solo para calcular los índices de rendimiento diagnóstico (cuadros 1 y 2).

Asimismo, se obtuvieron muestras de suero de casos no tratados, que se enviaron congeladas al Laboratorio de Seroepidemiología del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, donde, mediante pruebas de IF y de ELISA, se investigó la presencia de anticuerpos IgG, IgM e IgA anti-*Leishmania*. También se reunieron muestras de suero de un grupo de 49 controles sanos o con diagnósticos clínicos e histopatológicos de enfermedades cutáneas como frambesias, cromomycosis, eczema, úlceras varicosas o esporotricosis, pero con resultados negativos en las pruebas parasitológicas para detectar especies de *Leishmania*. Los pacientes y los controles pertenecían a la misma población.

Antígenos

Antígenos para la IF. Estos antígenos se prepararon de la forma descrita por Guimarães *et al.* (8), utilizando promastigotes tipo *Leishmania major* (MHOM/BR/71/49) cultivados durante siete días en un medio de infusión de hígado y triptosa (IHT) (13).

Antígenos para el ELISA. Estos antígenos se prepararon de acuerdo con las indicaciones de Guimarães *et al.* (10), empleando promastigotes tipo *L. major* (MHOM/BR/71/49) cultivados durante siete días en IHT.

Pruebas de IF

Las pruebas de IF para detección de anticuerpos IgG e IgM se efectuaron usando la técnica descrita por Guimarães *et al.* (8), mientras que los anticuerpos IgA se detectaron con las pruebas de IF descritas por Shaw y Lainson (14); los conjugados eran específicos para las cadenas pesadas. Los anticuerpos IgM se detectaron después de la absorción de los sueros por la inmunoglobulina agregada mediante calor (15).

Como título de punto final se tomó la dilución final necesaria para obtener una membrana continua, verde brillante, y

CUADRO 1. Índices de rendimiento diagnóstico de las pruebas de inmunofluorescencia (IF) y de los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para la detección de antígenos en sueros de pacientes con leishmaniasis del norte y el nordeste de Brasil

	Índice de rendimiento (%)		
	Sensibilidad	Especificidad	Eficiencia
Pacientes con leishmaniasis cutánea frente a los controles			
IF-IgG	27,7 (22,9, 3,31) ^{a,b}	71,4 (57,6, 82,1)	34,0
IF-IgM	20,5 (16,3, 25,5) ^b	87,8 (75,8, 94,3)	30,2
IF-IgA	3,1 (1,6, 5,7) ^b	100,0 (0,927, 1,0)	17,1
ELISA-IgG	66,9 (61,3, 72,1)	77,5 (64,1, 87,0)	68,4
ELISA-IgM	56,6 (50,8, 62,3)	72,9 (59,0, 83,4)	59,0
Pacientes con leishmaniasis ^c frente a los controles			
IF-IgG	28,2 (23,4, 33,5) ^b	71,4 (57,6, 82,1)	31,2
IF-IgM	21,0 (16,8, 25,9) ^b	87,8 (75,8, 94,3)	30,2
IF-IgA	4,3 (2,5, 7,9) ^b	100,0 (92,7, 100,0)	17,6
ELISA-IgG	66,3 (60,8, 71,4)	77,5 (64,1, 87,0)	67,9
ELISA-IgM	56,2 (50,5, 61,8)	72,9 (59,0, 83,4)	58,5

^a Las cifras entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza de 95%.

^b El intervalo incluye el valor que se obtendría solo por azar

^c Leishmaniasis cutáneas y mucocutáneas.

CUADRO 2. Índices de rendimiento diagnóstico de las pruebas de inmunofluorescencia (IF) y de los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para la detección de antígenos en sueros de pacientes con leishmaniasis del norte y el nordeste de Brasil

	Índice de rendimiento (%)	
	Valor predictivo positivo	Valor predictivo negativo
Pacientes con leishmaniasis cutánea frente a los controles		
IF-IgG	85,3 (76,8, 91,0) ^{a,b}	14,2 (10,4, 19,1) ^b
IF-IgM	90,9 (81,5, 95,6) ^b	15,6 (11,8, 20,4) ^b
IF-IgA	100,0 (70,1, 100,0) ^b	14,8 (11,4, 19,0) ^b
ELISA-IgG	94,6 (94,6, 96,9)	28,6 (21,6, 36,8)
ELISA-IgM	92,6 (87,7, 95,6)	22,0 (16,3, 29,1)
Pacientes con leishmaniasis ^c frente a los controles		
IF-IgG	86,0 (77,9, 91,5) ^b	13,8 (10,1, 18,6)
IF-IgM	91,4 (82,5, 96,0) ^b	15,1 (11,4, 19,8) ^b
IF-IgA	100,0 (77,2, 100,0) ^b	14,4 (11,1, 18,5) ^b
ELISA-IgG	94,8 (90,9, 97,0)	27,3 (20,6, 35,3)
ELISA-IgM	92,8 (88,0, 95,7)	21,2 (15,7, 28,1)

^a Las cifras entre paréntesis corresponden a los intervalos de confianza de 95%

^b El intervalo incluye el valor que se obtendría solo por azar

^c Leishmaniasis cutáneas y mucocutáneas.

fluorescencia del flagelo. En todas las pruebas se incluyeron un suero control positivo y uno negativo.

Métodos de ELISA

Los ELISA se efectuaron empleando el procedimiento utilizado por Guimarães *et al.* (10), con una IgG anti-humana (específica para la cadena γ) o una IgM anti-humana (específica para la cadena μ) conjugada con peroxidasa de rábano (tipo VI),⁵ según el método de Nakane y Kawaoi (16). El cromógeno estaba constituido por 200 μ l de una solución de 5,2 mmol/l de ácido 5-aminosalicílico y 1,5 mmol/l de peróxido de hidrógeno.⁵ En todos los ensayos se incluyeron los siguientes controles: un suero positivo, tres mezclas de sueros negativos que contenían 10 sueros cada una (previamente se había comprobado mediante pruebas de IF y de ELISA que no tenían anticuerpos anti-*Leishmania* y anti-*Trypanosoma*), conjugado y antígeno. Como título de punto final se tomó la absorbancia justo por encima de la media + 2 desviaciones estándares de las mezclas de suero negativo a una dilución de 1:20.

Los anticuerpos IgM se detectaron después de la absorción de los sueros mediante inmunoglobulina agregada por calor (15).

Análisis estadístico

En cada prueba, se usó el título serológico de cada muestra para construir las tablas de contingencia 2×2 con el fin de clasificar los sueros según el atributo de la enfermedad (LC o no, formas de leishmaniasis o no). Se pudieron entonces determinar las frecuencias de los resultados positivos verdaderos, negativos verdaderos, positivos falsos y negativos falsos con respecto al atributo de la enfermedad. Los índices de rendimiento diagnóstico tales como la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y negativo, y la eficiencia se calcularon

empleando las fórmulas descritas por otros investigadores (17), en tanto que los intervalos de confianza de 95% se estimaron con el método de Wilson (18) usando Diagval (Franco, EL y Simons R, programa inédito de computación, 1985), una plantilla adaptada para el programa Lotus 123.

RESULTADOS

Pruebas cutáneas y de improntas de lesiones

Mediante la prueba cutánea de Montenegro, se evaluó a 194 pacientes (47,9% de los incluidos) y mediante la impronta de lesiones, a 276 (55,7% de los que respondieron).

Pruebas serológicas

Para comparar la respuesta anti-*Leishmania* para cada antígeno, se usó la proporción de sueros con títulos superiores al punto de corte establecido para cada prueba ($\geq 1:40$ en el ELISA-IgG, $1:10$ en la IF-IgA y $\geq 1:20$ en las pruebas de IF y en el ELISA-IgM).

Pruebas de inmunofluorescencia. En la prueba de IF-IgG, 27,7% de los sueros de pacientes con LC tenían títulos $\geq 1:20$, en la IF-IgM, 20,5% de los sueros tenían títulos $\geq 1:20$, y en la IF-IgA, 31% de los sueros de casos con LC (nueve pacientes) mostraron una respuesta positiva. Uno de estos pacientes presentaba síntomas desde hacía dos meses, mientras que cinco habían tenido síntomas de tres a seis meses de duración, lo cual indica que el estado invasor de la enfermedad puede presentarse antes de lo que estimaron Shaw y Lainson (14). Cinco de los sueros se obtuvieron en el estado norteño de Amapá y los restantes, en los estados del nordeste del país; dos de los pacientes tenían siete años de edad. La investigación del parásito fue positiva en

⁵ Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA.

cuatro pacientes y negativa en uno; además, la prueba cutánea de Montenegro fue positiva en cinco pacientes. Se detectó una asociación positiva entre los resultados de la IF-IgA y la procedencia del suero ($P = 0,0015$).

Ensayos inmunoenzimáticos. La distribución de los títulos de los anticuerpos IgG fue la siguiente: 32,5% de los sueros tenían títulos $< 1:40$, en tanto que 67,5% presentaron títulos $> 1:40$. Se observó una asociación positiva entre el título de anticuerpos en el ELISA-IgG y la procedencia del suero ($P = 0,0366$), así como con la edad ($P = 0,0006$) y el sexo ($P = 0,0174$) de los pacientes.

En el ELISA-IgM, la distribución de los títulos de IgM fue la siguiente: 44,5% fueron $< 1:20$, y 55,5%, $> 1:20$. También se detectó una asociación positiva entre los títulos en el ELISA-IgM y la procedencia del suero ($P = 0,0001$) y con la edad de los pacientes ($P = 0,0126$), ya que 72% de los sueros de los niños (18 de 25 sujetos tenían entre uno y 17 años de edad) y 55,6% de los de los adultos (148 de 266 sujetos tenían entre 18 y 40 años de edad) dieron resultados positivos en el ELISA-IgM.

Índices de rendimiento diagnóstico

Al basar el diagnóstico de leishmaniasis en los resultados positivos de una prueba de impronta de lesiones o de una prueba cutánea de Montenegro y en el punto de corte del título preestablecido para cada prueba, se pudo evaluar la utilidad clínica y epidemiológica relativa de las cinco pruebas para detectar anticuerpos anti-*Leishmania*. Los cuadros 1 y 2 muestran los resultados de un análisis de ese tipo, expresados como índices de rendimiento diagnóstico con sus respectivos intervalos de confianza de 95% para las cinco pruebas en los grupos de pacientes con LC y con LC más LMC. Como indica el número total de diagnósticos correctos tanto positivos como negativos (índice de eficiencia), el mejor indicador de la enfermedad en

ambos grupos fue el ELISA-IgG, seguido por el ELISA-IgM. Estas fueron las únicas pruebas con sensibilidad, especificidad y valores predictivos (positivos y negativos) significativamente distintos de los que se esperarían solo por azar.

DISCUSIÓN

Aunque para efectuar el estudio se utilizaron antígenos preparados a partir de parásitos tipo *L. major*, *L. b. braziliensis* y *L. b. guyanensis* son las especies prevaletentes en la zona donde se llevó a cabo la investigación. En la actualidad, aún no es posible cultivar parásitos del complejo *L. braziliensis* para producir la gran cantidad de promastigotes necesarios para realizar las pruebas serológicas descritas.

Como se muestra en el cuadro 1, los valores de los índices de eficiencia de las pruebas de ELISA, que constituyen una medida de la capacidad de la prueba para detectar la existencia o la ausencia de la enfermedad, fueron el doble de los obtenidos con las pruebas de IF, independientemente de que se usaran los sueros de los pacientes con LC para calcular el índice o de que se incluyeran también los sueros pertenecientes a los 13 pacientes con LMC invasora. Además, la sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivos positivos y negativos, de las pruebas de ELISA en los sueros de los pacientes con LC y LMC fueron significativamente diferentes de los que se hubieran obtenido solo por azar (véanse los cuadros 1 y 2).

La especificidad de las pruebas de IF fue elevada (87,8% en la de IF-IgM y 100% en la de IF-IgA). No obstante, la especificidad de la IF-IgG fue más baja que la del ELISA-IgG en los sueros de pacientes con LC o LMC. La significación de la especificidad no es útil para establecer un diagnóstico de exclusión de los resultados positivos falsos, ya que el valor predictivo positivo de las tres pruebas de IF carece de significación (véanse los cuadros 1 y 2).

También se investigó el rendimiento de las pruebas de IF y de ELISA en sueros de pacientes con leishmaniasis de larga evolución (12) y, como se esperaba, los índices difirieron de los señalados anteriormente. Fue notable el rendimiento del ELISA-IgM. En los sueros de los casos de larga evolución, los índices de rendimiento de esta prueba no fueron significativamente diferentes de los que se obtendrían solo por azar; sin embargo, en este estudio, probablemente porque se trataba de casos de más corta evolución, los índices del ELISA fueron significativamente diferentes de los que se obtendrían solo por azar.

En general, siempre que los valores de esos índices fueron significativamente distintos de los que se obtendrían solo por azar (tanto en los casos antiguos como en los del presente estudio), los valores de los obtenidos en la presente investigación fueron los más bajos. Por el contrario, el valor predictivo positivo del ELISA-IgG aumentó de 73,7% en los casos de larga duración a 94,6% en los pacientes de este estudio, lo cual permitió detectar los casos positivos verdaderos entre el número más elevado de presuntos casos. Cuando se examinaron los sueros utilizados en la presente investigación mediante la prueba Dot-ELISA (Guimarães *et al.*, resultados inéditos, 1989), la especificidad aumentó a 91,4% y el valor predictivo positivo, a 98,8%. Por consiguiente, los resultados obtenidos en este trabajo con el ELISA muestran que las pruebas serológicas para la leishmaniasis cutánea pueden emplearse para el diagnóstico, incluso con un antígeno heterólogo tipo *L. major*.

La capacidad diagnóstica de la IF-IgA no está claramente determinada; por ejemplo, si bien su sensibilidad no fue significativamente distinta de la que se obtendría solo por azar, nueve casos que se diagnosticaron como LC solo tenían pruebas de IF-IgA

positivas. Como ninguno de los controles dio resultados positivos en las reacciones cruzadas, esos pacientes constituían casos invasores verdaderos de la enfermedad (LMC) que aún se encontraban en la etapa cutánea y, a menos que se les proporcionara un tratamiento y seguimiento adecuados, podrían padecer invasión de la mucosa bucofaringea.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento a N. Campos Filho y a P. de Oliveira por su valiosa asistencia técnica. El estudio contó con el apoyo del Programa Especial PNUD/Banco Mundial/OMS de Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (Subvención No. 840453), del Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)-PIDE VI (Subvención No. 403608-84) y de los Laboratórios de Investigaçao Médica (LIM-38).

REFERENCIAS

1. Office for the Supervision of Public Health Campaigns. Department for Eradication and Control of Endemics. [Control of endemics in Brazil (1979–1984)]. Brasilia: Ministry of Health; 1985 (en portugués).
2. Office for the Supervision of Public Health Campaigns. Department of Eradication and Control of Endemics. [Results obtained in 1985 and projected for 1986]. Brasilia: Ministry of Health; 1986 (en portugués).
3. Anthony RL, et al. Subcellular and taxonomic specificity of monoclonal antibodies to New World *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34:1085–1094.
4. Miles M. Biochemical identification of the leishmanias. *Bull Pan Am Health Organ.* 1985;19:343–353.
5. Wirth DF, et al. Leishmaniasis and malaria: new tools for epidemiologic analysis. *Science.* 1986; 234:975–979.
6. Cuba Cuba CA, et al. Diagnóstico parasitológico e inmunológico de leishmaniasis tegumentaria americana. *Bol Of Sanit Panam.* 1980; 89(3):195–208.

7. Montenegro J. [Cutaneous reactions in leishmaniasis]. *An Fac Med Univ Sao Paulo*. 1926;1:323-330 (en portugués).
8. Guimarães MCS, et al. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1974; 16:145-148.
9. Anthony RL, et al. Micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1980;29:190-194.
10. Guimarães MCS, et al. Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape valley. IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983;25:99-108.
11. Guimarães MCS, et al. Evaluation of Dot-enzyme-linked immunosorbent assay for mucocutaneous leishmaniasis and comparison with microplate enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*. 1986; 24:364-367.
12. Guimarães MCS, et al. Evaluation of serological diagnostic performance indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bull World Health Organ*. 1989;67:643-648.
13. Fernandes JF, Castellani O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1966;18:195-202.
14. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil, XIV. Leishmanial and trypanosomal IgA antibody in patients with leishmaniasis and Chagas' disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1981;75:254-257.
15. Camargo ME, et al. Rheumatoid factors as a cause for false IgM anti-toxoplasma fluorescent tests. A technique for specific results. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1972;14:310-313.
16. Nakane PK, Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*. 1974;22:1084-1091.
17. Galen RS, Gambino SR. Beyond normality: the predictive value and efficiency of medical diagnoses. New York: John Wiley; 1975.
18. Rothman KJ, Boice JD. Epidemiologic analysis with a programmable calculator. Boston, MA: Epidemiologic Resources, Inc.; 1982.

SUMMARY

DIAGNOSTIC PERFORMANCE INDICES FOR IMMUNOFLUORESCENT TESTS AND ENZYME IMMUNOASSAYS OF LEISHMANIASIS SERA FROM NORTHERN AND NORTH-EASTERN BRAZIL

A total of 341 sera were screened for anti-*Leishmania* IgA, IgG, and IgM antibodies by immunofluorescent (IF) tests and

enzyme immunoassay (ELISA). Altogether, 292 of the sera originated from patients with clinically as well as parasitologically diagnosed (positive lesion imprint or the Montenegro skin test) cutaneous leishmaniasis; 49 of the sera were from controls from the same base population.

In terms of diagnostic performance, the ELISAs for IgG and IgM yielded indices of diagnostic utility, and the positive predictive value of the IgG-ELISA was 94.6%. A remarkably high specificity (100%) was obtained with the IgA-IF test, but its sensitivity was very low.