

LA PRUEBA DOT-ELISA PARA LA DETECCION DE CAMPO DE LA LEISHMANIASIS VISCERAL EN HONDURAS¹

*Bryce C. Walton,² Michael G. Pappas,² Manuel Sierra b.,³
Ruta Hajkowski,² Peter Jackson² y Ramón Custodio³*

INTRODUCCION

Las pruebas serológicas se consideran universalmente como un instrumento indispensable para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral en los servicios de atención de salud. Además, el diagnóstico serológico es el procedimiento individual más valioso en cualquier programa de vigilancia, ya que permite la selección rápida de poblaciones numerosas en zonas remotas sin tener que recurrir al examen clínico, proporciona datos sobre la incidencia en la población y constituye un método eficaz para la detección temprana de casos (1).

Se han utilizado varios tipos de pruebas con un grado generalmente aceptable de fiabilidad como medios auxiliares para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral. Ellas son la fijación del complemento tanto con un antígeno bacteriano acidorresistente no específico (2)

como con un antígeno parasitario homólogo (3); la aglutinación directa (4) y la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes, que en la actualidad es la más utilizada (5). Recientemente se ha encontrado que también es eficaz la prueba de inmunoabsorbencia ligada a la enzima (ELISA), en la que se usan antígenos solubles (6, 7).

No obstante, a menudo es difícil utilizar eficientemente las pruebas serológicas en zonas endémicas, porque deben efectuarse en un laboratorio central y los pacientes viven en lugares remotos donde son escasos los medios de transporte y comunicación. En consecuencia, generalmente solo es posible usar técnicas serológicas en el caso de los pacientes que concurren a un hospital bien equipado. En muchas ocasiones esto retrasa el diagnóstico por un período prolongado, lo cual implica un gran riesgo, ya que el paciente no es examinado en una institución médica con medios de diagnóstico adecuados hasta que ha enfermado gravemente. La obtención de pruebas serológicas en las que se utilizan muestras de

¹ Se publica en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization* Vol. 20, No. 2, 1986.

² Walter Reed Army Institute of Research, Department of Immunology, Washington, DC 20307, EUA. Las opiniones de los autores no representan necesariamente la posición del Departamento del Ejército ni del Departamento de la Defensa de los Estados Unidos de América.

³ Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Tegucigalpa, Honduras.

sangre seca sobre papel filtro ha representado un progreso en este sentido, en particular para los estudios seroepidemiológicos, puesto que se han simplificado la toma y el procesamiento de las muestras y se ha eliminado la necesidad de refrigeración durante el transporte. Sin embargo, son muy pocos los servicios de atención primaria de salud que pueden recibir este servicio de diagnóstico de un laboratorio central.

Una prueba que pudiera efectuarse en las aldeas, sin ningún tipo de instalaciones de laboratorio, una verdadera "prueba de campo", tendría un valor incalculable para mejorar la atención brindada a los pacientes y para la vigilancia epidemiológica en zonas endémicas. En la actualidad, aun si se dispone de servicios para el diagnóstico serológico, son considerables las demoras entre la toma de muestras y la obtención de los resultados de una prueba y, cuando estos son positivos y corresponden a un paciente que vive en una aldea lejana a la que se llega solo después de varias horas de viaje a caballo o a pie, el médico o autoridad de salud responsable enfrenta el problema de localizar al paciente y llevarlo a una institución médica donde se pueda confirmar el diagnóstico, con la consiguiente demora. En consecuencia, si se pudiera efectuar la prueba en el momento en que se toma la muestra, resultaría mucho más valiosa y, cuando se obtuvieran resultados positivos, se podrían hacer de inmediato arreglos para resolver problemas de transporte o similares, de modo que el paciente fuera trasladado a un centro de atención de salud para reali-

zar las biopsias confirmatorias y, en caso necesario, administrar sin demora el tratamiento.

Una prueba de este tipo para uso en el campo debe reunir las siguientes características: 1) requerir un volumen pequeño de sangre o suero (que se pueda obtener sin recurrir a la venipuntura); 2) no ser costosa; 3) utilizar material y equipo que no se dañen o alteren fácilmente y que se puedan transportar con facilidad a caballo o a pie; 4) no necesitar electricidad o instalaciones que tal vez no existan en aldeas de los países en desarrollo; 5) no requerir temperaturas estrictamente reguladas; 6) producir resultados que puedan identificarse a simple vista; y 7) producir los resultados en el lapso de unas horas.

La prueba dot-ELISA fue adaptada por Pappas *et al.* al estudio de las enfermedades parasitarias (8, 9); es una microtécnica donde se usa como antígeno una suspensión de promastigotos de *Leishmania donovani* que va impregnada en forma de puntos (*dots* en inglés, de ahí el nombre) sobre discos de filtro de nitrocelulosa de la marca Millipore. Los resultados se pueden interpretar a simple vista y el equipo es portátil y de bajo costo; además, la sensibilidad y especificidad de la técnica son similares a las de la prueba ELISA ordinaria y superiores a las de la prueba de fijación del complemento (FC) (9). Como parecía cumplir los requisitos esenciales y ser adaptable al empleo sobre el terreno, se escogió esta técnica para efectuar un ensayo preliminar en una zona endémica de Honduras (10-11).

Las localidades rurales aisladas donde se llevó a cabo el trabajo son representativas de aquellas en las que se encuentra la enfermedad en el Nuevo Mundo. La investigación constituye así un ensayo realista en las condiciones difíciles que probablemente se encuentran en otras zonas endémicas.

MATERIALES Y METODOS

Localidades y sujetos incluidos en el ensayo

La base para seleccionar localidades y sujetos para el ensayo fueron los pacientes con diagnóstico previo de leishmaniasis visceral que pudieron ser localizados. Las 305 personas incluidas se clasificaron en los cuatro grupos siguientes:

Grupo I: formado por nueve pacientes con leishmaniasis visceral que tenían de cuatro a ocho años de edad, cuya enfermedad había sido diagnosticada mediante estudios parasitológicos entre dos y siete años antes y tratada con antimonio de meglumina (Glucantime).

Grupo II: integrado por 45 familiares (44 hermanos, una madre) de los pacientes anteriores, que representaban un grupo de alto riesgo.

Grupo III: constituido por un total de 244 niños cuyas edades variaban entre los seis meses y los ocho años, que residían en las mismas localidades u otras cercanas, seleccionados mediante muestreos aleatorios en clínicas, escuelas y viviendas.

Grupo IV: formado por sujetos con infecciones por otros hemoflagelados, incluidos tres niños con leishmaniasis cutánea crónica y extensa, con lesiones múltiples diseminadas y diagnóstico parasitológico, y cuatro sujetos con enfermedad de Chagas diagnosticada mediante pruebas serológicas.

La mayoría de las localidades involucradas se encontraban en la región suboccidental del país, en una zona endémica conocida. Seis estaban en el municipio de San Francisco de Coray y tres en el de Choluteca; también se incluyeron diversas localidades pequeñas de los municipios de Nacaome y San Lorenzo, y se tomaron además algunas muestras en un barrio de Tegucigalpa, donde residía un paciente infectado anteriormente en San Francisco de Coray.

Muestras de sangre

Las muestras de sangre tomadas mediante punción de la yema del dedo se recogieron en tubos capilares de 0,1 ml, que luego se cerraron con arcilla de moldear y de inmediato se agitaron enérgicamente —como se sacude un termómetro— para eliminar cualquier burbuja de aire. Se conservaron las muestras a la temperatura ambiente durante una a cuatro horas para acelerar la coagulación y la retracción del coágulo; luego se almacenaron en hielo hasta el momento del procesamiento.

Para extraer el suero, con una lima se hizo una muesca en la parte inferior del tubo justo por encima del tapón de arcilla y se quebró el tubo. El coágulo estaba por lo general adherido al tapón y se podía extraer completo manteniendo el tubo en posición casi horizontal, con lo que quedaba en el tubo el suero esencialmente transparente. Si quedaban algunos glóbulos rojos, estos no alteraban la prueba.

Se diluyeron los sueros con solución salina amortiguada con fosfato (SSAF), que contenía 1% de albúmina sérica bovina (ASB). Se insertó la punta de plástico de una micropipeta en el extremo del tubo capilar y se retiró 0,01 ml de suero, que se colocó en 0,15 ml de diluyente en una celdilla de la placa de microtitulación (para obtener una dilución

inicial de 1:16); se transfirieron a continuación 0,05 ml de esta última solución a una celdilla de prueba que contenía un disco de antígeno (véase más adelante) y un volumen igual de diluyente para obtener una dilución final de 1:32 para la prueba de selección.

Preparación del antígeno

En otro trabajo se ha descrito en detalle la preparación de antígeno para la prueba dot-ELISA (8). La suspensión de antígeno utilizada se preparó en el Instituto "Walter Reed" con promastigotos de *L. donovani* (WR 311); luego se distribuyó sobre discos de filtro de nitrocelulosa en forma de puntos con un volumen de 1 μ l ($2,5 \times 10^4$ parásitos). Los "puntos" se colocaron en el centro de círculos de 6 mm de diámetro marcados sobre el disco de nitrocelulosa; con un sacabocados se cortaban discos de antígeno a medida que eran necesarios en el trabajo sobre el terreno.

Procedimiento para efectuar la prueba

La prueba dot-ELISA se efectuó en placas ordinarias de microtitulación, de fondo plano y con 96 celdillas, esencialmente en la forma descrita por Pappas *et al.* (8); la única modificación importante fue el empleo de SSAF con pH de 7,4, en lugar de solución salina amortiguada con trietanolamina (SSAT). La SSAF se transportó como concentrado 10X para ahorrar espacio y peso, y en Honduras se diluyó con agua destilada. En cuanto al almacenamiento en el terreno, el antígeno, la albúmina de suero bovino, los sueros testigos, el conjugado y el sustrato se conservaron en un recipiente de material aislante, protegidos de las temperaturas elevadas con hielo u otros refrigerantes. No obstante, rara vez se logró mantener la temperatura de 4 °C recomendada, a causa de las altas

temperaturas ambientes que a veces llegaban a los 30–34 °C. Las pruebas se efectuaron a una temperatura ambiente que llegó a 28–30 °C.

Las placas de microtitulación se agitaron a mano en las diversas reacciones, mediante el movimiento rotatorio en círculos pequeños sobre una mesa, en lugar de usar el agitador mecánico indicado en la descripción original del procedimiento. Se cortaron discos de antígeno del filtro de nitrocelulosa y se colocaron en las celdillas de las placas de microtitulación inmediatamente antes de cada serie de pruebas.

El procedimiento de prueba se puede sintetizar de la siguiente manera:

1) *Bloqueo*: Agregar 0,075 ml de ASB⁴ al 5% en SSAF a cada celdilla que contiene un disco de antígeno. Agitar la placa de microtitulación por un minuto, incubar durante 30 minutos y aspirar.

2) *Reacción de anticuerpos*: Colocar 0,1 ml de suero de prueba (diluido en una proporción de 1:32 en SSAF con 1% de ASB) en la celdilla, agitar por un minuto, incubar durante 30 minutos y aspirar.

3) *Lavado*: Lavar los discos agregando 0,1 ml de NP-40⁵ al 0,05% en SSAF. Agitar durante un minuto y aspirar. Repetir dos veces la operación y luego dejar la solución en reposo 10 minutos en el tercer lavado.

4) *Reacción del conjugado*: Agregar a cada celdilla 0,05 ml de antiglobulina de cabra dirigida contra la

⁴ Albúmina de suero bovino, fracción V; Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EUA.

⁵ Nonidet P-40 (agente tensioactivo no iónico); Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, California, EUA.

IgG humana (específica para la cadena gamma) conjugada con peroxidasa de rábano purificada en cuanto a la afinidad⁶, óptimamente diluida en una proporción de 1:100 en SSAF con 1% de ASB. Agitar un minuto, incubar durante 30 minutos y aspirar. Repetir tres veces esta operación.

5) *Revelado del sustrato*: Agregar a cada celdilla de prueba 0,05 ml del sustrato precipitable 4C1N⁷, agitar un minuto, incubar durante 30 minutos y aspirar. Lavar dos veces con SSAF (sin ASB) y una tercera vez con agua destilada. Aspirar y dejar secar al aire.

Los microvolúmenes de sueros y otros reactivos se midieron con una pipeta de volumen graduable⁸, con puntas desechables de material plástico. Sin embargo, los volúmenes de las soluciones para lavado no tenían importancia decisiva y, por tanto, no se midieron con precisión; se vertieron en las celdillas con una pipeta Pasteur, calculando la cantidad de 0,1 ml necesaria para el lavado. Todas las soluciones se retiraron de las celdillas con una pipeta Pasteur conectada a una jeringa de 20 ml por un trozo de sonda quirúrgica de goma de 0,6 cm de diámetro, dispositivo que facilitó la aspiración del contenido de las celdillas en rápida sucesión.

⁶ Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc.; Gaithersburg, Maryland, EUA.

⁷ El 4-cloro-1-naftol, un sustrato de carácter precipitable y cromógeno con el peróxido (Kirkegaard and Perry Laboratories), se preparó agregando volúmenes iguales de la solución de sustrato y diluyendo luego con SSAF en una proporción de 1:3.

⁸ Pipetman de la marca Gilson (0,001 ml-0,2 ml).

RESULTADOS

Las reacciones positivas se presentaron como puntos de color morado azulado sobre los discos blancos de filtro de nitrocelulosa. En algunos casos, los puntos se volvían más definidos a medida que se secaba el disco. No hubo prácticamente ninguna reacción ambigua, ya que aparecían los puntos de color o no aparecía nada. Los sueros positivos usados como testigos dieron resultados positivos en todas las series de pruebas, en tanto que los sueros negativos y los reactivos utilizados como testigos no produjeron reacciones.

Hubo diferencias significativas entre las tasas de positividad correspondientes a los cuatro grupos examinados (cuadro 1). En el grupo I, en ocho de nueve (88,9%) de los pacientes con leishmaniasis visceral diagnosticada mediante estudios parasitológicos, se obtuvieron reacciones positivas en la prueba de selección con una dilución de 1:32. En el grupo II, constituido por los familiares, presuntamente más expuestos a la infección, en 13 de 45 (28,9%) la reacción fue positiva. Por el contrario, solo 8 de los 244 (3,3%) niños aparentemente sanos integrantes de la población general de la zona presentaron reacciones positivas.

También se obtuvo un número notable de respuestas positivas en los sujetos con infecciones por protozoarios afines (grupo IV). Tres de los cuatro sujetos con enfermedad de Chagas diagnosticada mediante estudios serológicos y uno de los tres niños con lesiones crónicas, extensas y de leishmaniasis cutánea, también presentaron respuestas positivas.

En consecuencia, los sueros de los pacientes con leishmaniasis visceral del grupo I y de los pacientes con leishmaniasis cutánea y enfermedad de Chagas del grupo IV que habían dado re-

CUADRO 1. Resultados de la prueba dot-ELISA en los cuatro grupos en los que se investigó la presencia de leishmaniasis visceral en Honduras

Grupo	Diagnóstico	Sujetos (No.)	Resultados positivos	
			(No.)	(%)
I	Sujetos con diagnóstico de leishmaniasis visceral que habían recibido tratamiento	9	8	88,9
II	Familiares de los sujetos sometidos a tratamiento	45	13	28,9
III	Muestra aleatoria de niños de las zonas de gran exposición	244	8	3,3
IV	Sujetos con infecciones por hemoflagelados:			
	1) Leishmaniasis cutánea con lesiones múltiples diseminadas	3	1	33,3
	2) Enfermedad de Chagas	4	3	75,0
Total		305	33	10,8

sultados positivos, se examinaron con el fin de determinar los títulos de punto final (cuadro 2). Los nueve pacientes del grupo I con leishmaniasis visceral previamente diagnosticada que habían recibido tratamiento presentaron reacciones con títulos que fluctuaron entre 1:512 y 1:8 192. El único suero correspondiente

al grupo I que, inexplicablemente, no había mostrado reacción en la prueba de selección, tuvo un título de punto final de 1:1 024. Los títulos recíprocos correspondientes a los sueros de pacientes del grupo IV con infecciones por otros he-

CUADRO 2. Títulos de punto final de sueros de sujetos de los grupos I y IV que dieron reacción positiva en la prueba de selección

Paciente	Edad (años)	Sexo	Diagnóstico clínico ^a	Tiempo del diagnóstico (años)	Título de punto final
1	4	M	LV	2	8 192
2	5	F	LV	3	512
3	6	F	LV	4	4 096
4	6	F	LV	4	2 048
5	6	M	LV	4	2 048
6	7	F	LV	5	512
7	8	M	LV	5	4 096
8	8	F	LV	6	512
9 ^b	8	M	LV	7	1 024
10	8	F	LC	1	32 768
11	47	M	EC	NT ^c	4 096
12	63	M	EC	NT	4 096
13	60	F	EC	NT	2 048

^a LV = leishmaniasis visceral; LC = leishmaniasis cutánea; EC = enfermedad de Chagas

^b Con este sujeto se obtuvo una reacción negativa en la selección inicial con la prueba dot-ELISA en papel filtro a una dilución de 1:32.

^c NT = no tratados

moflagelados fluctuaron entre 2 048 y 32 768. Estos últimos títulos fueron sorprendentemente elevados, sobre todo porque en todos estos casos se habían obtenido títulos de solo 512 con antígeno de especies homólogas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las localidades donde se llevó a cabo esta investigación se consideran representativas de los lugares del Nuevo Mundo en los que se encuentra leishmaniasis visceral, y las condiciones difíciles en que se efectuó el presente estudio probablemente sean las que prevalezcan en otras zonas endémicas. Se comprobó que los discos de antígeno y los reactivos eran estables por períodos prolongados, y las temperaturas ambientes elevadas (de hasta 28 °C) que predominaron durante el ensayo no afectaron los resultados.

La falta de especificidad de la prueba, indicada por las reacciones positivas observadas en los sueros de un paciente con lesiones múltiples diseminadas de leishmaniasis cutánea y de tres de los cuatro sujetos con enfermedad de Chagas, probablemente es del mismo grado que cualquier otra prueba serológica en la que se utilizan promastigotos como antígeno. Tal vez se podría aumentar la especificidad usando amastigotos como antígeno, una mejora que se ha comprobado en el caso del empleo de la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes para diagnosticar leishmaniasis cutánea (13). No obstante, lograr de este modo algún aumento de la especificidad no tendría gran importancia práctica, ya que el propósito de los exámenes serológicos es seleccionar individuos para la evaluación clínica definitiva. Tanto en el caso de la leishmaniasis cutánea como en el de la enfermedad de Chagas, el diagnós-

tico temprano es beneficioso y no resulta difícil efectuar el diagnóstico diferencial. En consecuencia, desde el punto de vista de la atención primaria de salud en los países en desarrollo, el diagnóstico incidental de enfermedad de Chagas debe considerarse como un hallazgo afortunado y útil, más que como una desventaja.

El escaso número de reacciones positivas encontradas en la población general del grupo III probablemente fue en parte resultado de la utilización del anticuerpo secundario específico para IgG conjugado con peroxidasa de rábano purificada que, según se ha comprobado, disminuye el número y los títulos de las reacciones positivas falsas ocasionadas por enfermedades causadas por protozoarios afines y también por la hiperglobulinemia (fundamentalmente de IgM) observada en poblaciones que viven en los trópicos (9). No es posible en este momento determinar si las reacciones positivas en el grupo III representaban infecciones subclínicas de leishmaniasis visceral o fueron causadas por formas subclínicas de la enfermedad de Chagas o de otras infecciones por protozoarios afines.

Los nueve sujetos del grupo I (todos con infecciones anteriores de leishmaniasis visceral y que habían recibido tratamiento dos a siete años antes) tenían títulos considerablemente inferiores a los encontrados en los casos de enfermedad activa; estos últimos llegaron a veces a 1:524 288 (8). Estos títulos bajos probablemente fueron el resultado de disminuciones de las concentraciones de anticuerpos después del tratamiento, si bien no se conoce aún la respuesta temporal de los anticuerpos a un tratamiento eficaz. La posibilidad de una persistencia

tan prolongada de los anticuerpos indica que no se puede descartar un probable fracaso del tratamiento.

Solo se puede hacer un diagnóstico definitivo de leishmaniasis visceral mediante la comprobación de la presencia de parásitos, ya sea por examen directo o cultivo de material obtenido por lo general mediante biopsia de médula ósea o bazo. Si bien ahora se considera que la biopsia esplénica es un procedimiento inocuo y seguro para el diagnóstico y la evaluación de la eficacia del tratamiento (14), no está por completo exento de riesgos y normalmente no debe efectuarse fuera de un establecimiento médico. También requiere personal calificado y experto, y solamente debe llevarse a cabo cuando existen claros indicios clínicos de la infección.

En este contexto, la prueba serológica constituye un medio de selección que permite limitar este procedimiento de la biopsia, relativamente costoso y que exige cierto tiempo, a aquellos casos en que es grande la probabilidad de infección. Además, el diagnóstico serológico es sin duda el procedimiento individual más útil en cualquier programa de vigilancia de leishmaniasis visceral, ya que permite seleccionar poblaciones de zonas remotas abarcando un gran número de sujetos en un período breve, sin que sea necesario recurrir al examen clínico.

La prueba dot-ELISA en filtro de nitrocelulosa se considera un método práctico y económico para la selección rápida en las aldeas. Solo se requieren 0,05 ml de suero del paciente, cantidad que se obtiene con facilidad mediante la

punción de la yema del dedo. La prueba es barata (menos de cinco centavos de dólar estadounidense por cada celdilla de prueba) y puede ser realizada por personal sin un alto grado de capacitación técnica. Todo el material necesario puede ser transportado fácilmente a pie o a caballo y no se necesitan electricidad o instalaciones que por lo general no se encuentran en las aldeas. Creemos que esta prueba puede ser de gran utilidad en zonas de todo el mundo donde la leishmaniasis visceral es endémica.

RESUMEN

En una zona endémica de la República de Honduras, se llevó a cabo un ensayo sobre el terreno de la prueba de inmunoabsorbencia ligada a la enzima efectuada en disco de nitrocelulosa (dot-ELISA), como microtécnica rápida y susceptible de interpretarse a simple vista, para el diagnóstico serológico de la leishmaniasis visceral en el hombre. De los 305 sujetos investigados usando una dilución del suero de 1:32, se observaron reacciones positivas en ocho de los nueve casos de leishmaniasis visceral diagnosticada mediante estudio parasitológico que habían recibido tratamiento, en 13 de los 45 familiares de pacientes (grupo expuesto a un gran riesgo) y en ocho de los 244 niños seleccionados al azar en la zona endémica. Se observaron reacciones cruzadas en uno de los tres niños con leishmaniasis cutánea confirmada por estudio parasitológico y en tres de los cuatro adultos con resultados serológicos positivos para enfermedad de Chagas. La determinación de los títulos de punto final de los sueros de los pacientes con leishmaniasis visceral produjo títulos recíprocos que fluctuaron entre 512 y 8 192, inferiores a los que por lo general se encuentran en casos activos no tratados.

Esta prueba no requiere instalaciones eléctricas y todos los materiales pueden transportarse fácilmente a pie. Es un procedimiento rápido, sencillo, poco costoso y, no obstante, sensible y relativamente específico en las condiciones propias del terreno. Podría resultar un instrumento valioso para los servicios de atención primaria de salud y para las encuestas epidemiológicas en las numerosas zonas endémicas donde actualmente no es posible efectuar pruebas serológicas. □

A GRADECIMIENTO

Agradecemos el generoso apoyo y la ayuda brindados por el Dr. Omar González, Jefe de la División de Control de Vectores, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Honduras, y por el Dr. Hugo Villegas, Representante OPS/OMS, quienes hicieron posible la realización de este estudio. Los sueros de enfermos chagásicos fueron gentilmente proporcionados por el Dr. Carlos Ponce, del Laboratorio Central del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social de Honduras. Expresamos también nuestro reconocimiento a la Sra. Mary T. Nowicki y al Sr. John Stiteler por su asistencia técnica. El Programa Especial PNUD/Banco Mundial/OMS de Investigaciones y Enseñanzas sobre Enfermedades Tropicales otorgó su apoyo económico.

REFERENCIAS

- 1 Lobel, H. O. y Kagan, I. G. Seroepidemiology of parasitic diseases. *Annu Rev Microbiol* 32:329-347, 1978.
- 2 Pellegrino, J., Brener, Z. y Santos, U. M. Complement fixation test in kala-azar using *Mycobacterium butyricum* antigen. *J Parasitol* 44:645, 1958.
- 3 Hockmeyer, W. T., Wellde, B. W., Sabwa, C. L., Smith, D. H., Rees, P. H. y Kager, P. A. A complement fixation test for visceral leishmaniasis using homologous parasite antigen. *Ann Trop Med Parasitol* 78:489-493, 1984.
- 4 Allain, D. y Kagan, I. G. A direct agglutination test for leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 24:232-236, 1975.
- 5 Duxbury, R. E. y Sadun, E. H. Fluorescent antibody test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 13:525-529, 1964.
- 6 Hommel, M., Peters, W., Ranque, J., Quilici, M. y Lanotte, G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 72:213-218, 1978.
- 7 Edrissian, G. H. y Darabian, P. A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test in the serodiagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Iran. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 73:289-292, 1979.
- 8 Pappas, M. G., Hajkowski, R. y Hockmeyer, W. T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Immunol Methods* 64:205-214, 1983.
- 9 Pappas, M. G., Hajkowski, R. y Hockmeyer, W. T. Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 33:1105-1111, 1984.
- 10 Pappas, M. G., Hajkowski, R., Cannon Sr., L. T. y Hockmeyer, W. T. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): Comparison with standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 14:239-249, 1984.

- 11 Navin, T. R., Sierra, M., Custodio, R., Steurer, F., Porter, C. H. y Ruebush, T. Epidemiologic study of visceral leishmaniasis in Honduras. *Am J Trop Med Hyg* 34:1069-1075, 1985.
- 12 Martínez-Ponce, T. y Padilla, L. Leishmaniasis visceral. *Hondur Pediatr* 6:813-820, 1977.
- 13 Walton, B. C., Brooks, W. H. y Arjona, I. Serodiagnosis of American leishmaniasis by the indirect fluorescent antibody test. *Am J Trop Med Hyg* 21:296-299, 1972.
- 14 Rees, P. H., Kager, P. A. A., Welde, B. T. y Hockmeyer, W. T. The response of Kenyan kala-azar to treatment with sodium stibogluconate. *Am J Trop Med Hyg* 33:357-361, 1984.

SUMMARY

FIELD USE OF THE DOT-ELISA TEST FOR VISCERAL LEISHMANIASIS IN HONDURAS

The dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA), a rapid, visually read microtechnique for serodiagnosis of human visceral leishmaniasis, was field-tested in a known endemic area in the Republic of Honduras. Of 305 individuals screened at a serum dilution of 1:32, positive reactions were observed in eight of nine parasitologically diagnosed visceral leishmaniasis patients who had received treatment, 13 of 45 family members of patients (a high-risk group), and eight of 244 randomly selected children in

the endemic area. Cross-reactions were observed in one of three children with parasitologically confirmed cutaneous leishmaniasis and three of four adults serologically positive for Chagas' disease. End-point titrations performed on the visceral leishmaniasis sera gave reciprocal titers ranging from 512 to 8 192, which are lower than those usually encountered in untreated active cases.

This test does not require electricity, and all materials are easily transportable on foot. It is rapid, simple to perform, and inexpensive, yet sensitive and relatively specific under field conditions. It could prove to be a valuable tool for primary health care facilities and for epidemiologic surveys in the many endemic areas where no serologic testing capability currently exists.