



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE
UNA PRUEBA RÁPIDA EN FORMATO
LATERAL FLOW ASSAY (LFA) PARA
EL SERODIAGNÓSTICO DE
LEISHMANIASIS CUTÁNEA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

PERCY HUAIHUA PUMA

LIMA - PERÚ

2025

ASESOR:

DR. JORGE LUIS AREVALO ZELADA

JURADO DE TESIS

DRA. DIONICIA GAMBOA VILELA

PRESIDENTE

DRA. MELISSA MARLENE MÉNDEZ ARANDA

VOCAL

DRA. MANUELA VERASTEGUI PIMENTEL

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA

A Dios, mis padres Carmen y Florencio quienes me dieron todo lo necesario para mi formación personal y profesional. A mis hermanos Enrique, Luis Miguel y Juan José por estar siempre conmigo y darme su apoyo, confianza, cariño, paciencia, y sabias palabras.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, Dr. Jorge Arévalo Zelada por la aceptación, confianza y guía en mi formación como investigador. Por el asesoramiento en la elaboración del presente trabajo de investigación.

A la Dra. María Antonieta Quispe Ricalde, por abrirme las puertas a la investigación y su apoyo en el diagnóstico de las muestras de pacientes con sospecha de leishmaniasis, junto al Blgo. José Luis Sierra.

A la Dra. María Cruz por dar su tiempo al enrolamiento de pacientes y toma de muestras en la región de Cusco.

Al grupo de Pathoantígenos: María, Marco y Dina por su amistad y colaboración en el desarrollo del presente trabajo de investigación. Y de manera especial a Sueline y Aarom por su tiempo, paciencia y apoyo en el procesamiento de muestras por ELISA.

A mis tíos Alfredo y Martha quienes me trataron como un hijo más, durante mi estancia en Lima.

A mis queridos amigos, Karen, Karina, Rosmeri y Mario por su amistad y apoyo incondicional.

Al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y laboratorio de Malaria por las muestras de suero brindadas para su evaluación en la prueba LFA.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La realización de la presente Tesis ha sido posible gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC-ProCIENCIA). Por el financiamiento brindado, a través del proyecto: “Desarrollo de una prueba rápida en formato Lateral Flow Assay (LFA) para el diagnóstico de Leishmaniasis tegumentaria americana en centros de atención primaria de salud en áreas endémicas del Perú” (Contrato N° 095-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV).

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	18	FEBRERO	2025
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	HUAIHUA PUMA, PERCY		
PROGRAMA DE POSGRADO	MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2019		
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA RÁPIDA EN FORMATO LATERAL FLOW ASSAY (LFA) PARA EL SERODIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	TESIS		
Declaración del Autor El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	950684327		
E-mail	percy.huaihua@upch.pe		

Firma del egresado

DNI 70134524

ÍNDICE

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
III.	MARCO TEÓRICO	9
3.1.	El parásito <i>Leishmania</i> spp.....	9
3.1.1.	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	10
3.2.	Leishmaniasis	11
3.2.1.	Formas clínicas	11
3.2.2.	Leishmaniasis en el Perú.....	13
3.3.	Métodos de diagnóstico de leishmaniasis.....	14
3.3.1.	Métodos parasitológicos de diagnóstico.....	14
3.3.2.	Métodos moleculares	15
3.3.3.	Métodos inmunológicos de diagnóstico.....	16
3.4.	Antígenos inmunogénicos para el diagnóstico de leishmaniasis	18
3.4.1.	Histonas.....	18
3.4.2.	Proteína ribosomal	19
3.4.3.	Otros antígenos	20
3.5.	Ensayo de flujo lateral (LFA).....	21
3.5.1.	Principio de un ensayo de flujo lateral (LFA).....	21
3.5.2.	Componentes de biorreconocimiento	23
3.5.3.	Prueba de diagnóstico rápido de leishmaniasis	28
IV.	JUSTIFICACIÓN.....	31
V.	OBJETIVOS	34
VI.	METODOLOGÍA.....	35
6.1.	Diseño experimental.....	35
6.2.	Población y muestras de estudio.....	36
6.3.	Consideraciones éticas.....	37
6.4.	Toma de muestras.....	37
6.5.	Diagnóstico mediante la prueba de PCR cualitativa.....	38
6.6.	Inmunoensayo enzimático indirecto, ELISA, para la detección de anticuerpos anti-IgG en suero de pacientes humanos.	39
6.7.	Obtención de antígeno total soluble (ATSL) de <i>L. braziliensis</i>	40
6.8.	Péptido sintético opH2A de <i>Leishmania</i> :	41

6.9.1.	Prueba de eficiencia de inmovilización:.....	41
6.9.2.	Prueba de funcionalidad: Ensayo de Dot Blot.....	42
6.10.	Preparación de las tiras reactivas de diagnóstico – Prueba LFA	43
6.10.1.	Procedimiento de la prueba rápida en formato LFA	44
6.10.2.	Selección de las mejores condiciones de dilución del suero y del tipo de conjugado (oro coloidal y Nanoshell de oro) de la prueba LFA que utiliza opLiP2a	44
6.11.	Plan de análisis del serodiagnóstico de leishmaniasis	45
6.11.1.	Puntuación visual	45
6.11.2.	Intensidad Relativa – Porcentaje de positividad (PP).....	45
6.11.3.	Análisis de datos	45
VII.	RESULTADOS	47
7.1.	Establecimiento de las condiciones óptimas de fijación del Antígeno Total Soluble de Leishmania “ATSL” en la matriz de nitrocelulosa.....	47
7.1.1.	Selección del tipo de matriz de fijación del Antígeno Total Soluble de <i>Leishmania</i> “ATSL”.....	49
7.2.	Establecimiento de las condiciones óptimas de fijación del péptido antigénico opLiP2a, en la matriz de nitrocelulosa.	51
7.2.2.	Selección del tipo de matriz de fijación del péptido opLiP2a.....	54
7.3.	Selección del conjugado y límite de detección.....	56
7.4.	Comparación de las muestras de sueros positivos y negativos en la prueba rápida en formato LFA por puntuación visual e intensidad relativa.	57
7.4.1.	Correlación entre la puntuación visual e intensidad relativa de la prueba LFA que utiliza ATSL	57
7.4.2.	Correlación entre la puntuación visual e intensidad relativa de la prueba LFA que utiliza opH2A.	59
7.4.3.	Correlación entre la puntuación visual e intensidad relativa de la prueba LFA que utiliza opLiP2a.	60
7.5.	Estimación de la sensibilidad y especificidad de la prueba rápida en formato LFA	61
7.5.1.	Determinación del punto de corte y área bajo la curva de la puntuación visual de la prueba LFA.....	61
7.5.2.	Determinación del punto de corte y área bajo la curva de la intensidad relativa - porcentaje de positividad (PP%) de la prueba LFA	64
7.5.3.	Rendimiento de la prueba rápida en formato LFA	68
7.5.4.	Reactividad cruzada con otras enfermedades.....	76
VIII.	DISCUSIÓN.....	82
IX.	CONCLUSIÓN	92
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
	ANEXO	

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNk	Ácido desoxirribonucleico de kinetoplasto
AUC	<i>Area under the curve</i>
ATSL	Antígeno Total Soluble de <i>Leishmania</i>
CCI	Coefficiente de Correlación Intraclass
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
HRP	Horseradish Peroxidase
LFA	<i>Lateral Flow Assay</i>
LC	Leishmaniasis cutánea
LM	Leishmaniasis mucosa
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
NPV	Valor predictivo negativo
opH2A	Oligopéptido derivado de histona H2A de <i>L. infantum</i>
opLiP2a	Oligopéptido derivado de proteína ácida ribosomal P2a de <i>L. infantum</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
POC	<i>Point of care</i> (punto de atención)
PP	Porcentaje de positividad
PPV	Valor predictivo positivo
ROC	<i>‘Receiving Operating Curve’</i>
SD	<i>Standard deviation</i>

RESUMEN

En el Perú, la leishmaniasis cutánea (LC) es un problema de salud pública que afecta predominantemente a la población rural socioeconómicamente deprimida. El diagnóstico convencional para esta enfermedad incluye los métodos parasitológico, serológico y molecular, cada uno de los cuales presenta algunas limitaciones. Considerando que el diagnóstico temprano permite un tratamiento oportuno, existe la necesidad de una prueba simple, rápida y precisa con alta sensibilidad y especificidad, que pueda usarse como una alternativa apropiada y aplicable para el diagnóstico de la leishmaniasis cutánea en áreas endémicas con limitado acceso a los servicios de salud. En este estudio se desarrolló y validó una prueba rápida en formato *Lateral Flow Assay* (LFA) para el serodiagnóstico de leishmaniasis cutánea, que emplea independientemente Antígeno Total Soluble de *Leishmania* “ATSL” y los oligopéptidos sintéticos opH2A y opLiP2a. En el desarrollo de la prueba rápida; se utilizó un enfoque de unión del oligopéptido biotinilado a estreptavidina como proteína de anclaje que se une a la nitrocelulosa, también se consideró el pH y diferentes matrices sólidas de nitrocelulosa (FF080HP, FF120HP y FF170HP de Whatman/GE). La señal visible se probó con HRP-DAB, nanopartículas de oro coloidal y nanoshell de oro. Las condiciones óptimas se obtuvieron utilizando la membrana de nitrocelulosa FF120HP, con una concentración de 200 µg/mL de estreptavidina y 50 µg/mL de opH2A u opLiP2a; así mismo este ensayo presentó una mejor sensibilidad de detección con nanoshell de oro. En el caso del antígeno total (ATSL) se estableció a una concentración de 500 µg/mL en la matriz FF120HP en oro coloidal. Estas condiciones en conjunto

para los antígenos (opH2A, opLiP2a y ATSL) aplicadas a la tira LFA, brindaron un resultado a los 40 minutos. En la validación de la prueba LFA, el análisis de la puntuación visual de los antígenos evaluados, mostró un mejor perfil de diagnóstico el oligopéptido opLiP2a que reflejó una sensibilidad de 62.0% y especificidad de 94.6% a comparación del opH2a que tiene una sensibilidad de 36.0% y especificidad de 93.5%, e incluso fue mejor que el antígeno total (ATSL) que tiene una sensibilidad de 56.0% y una especificidad de 90.2%; este análisis se confirma cuando se mide por intensidad relativa - porcentaje de positividad. Finalmente, las características diagnosticas de los oligopéptidos (opLiP2a y opH2A) de la prueba LFA son similares a la prueba de ELISA que utiliza los mismos antígenos, corroborando con la prueba de Kappa que dio un acuerdo sustancial entre LFA y ELISA.

Palabras clave: Leishmaniasis cutánea, oligopéptidos sintéticos, Lateral flow Assay

ABSTRACT

In Peru, cutaneous leishmaniasis (CL) is a public health problem that predominantly affects the socioeconomically depressed rural population. Conventional diagnosis for this disease includes parasitological, serological and molecular methods, each of which presents some limitations. Considering that early diagnosis allows timely treatment, there is a need for a simple, rapid and accurate test with high sensitivity and specificity, which can be used as an appropriate and applicable alternative for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in endemic areas with limited access to health services. In this study, a rapid test in Lateral Flow Assay (LFA) format was developed and validated for the serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis, which independently uses Total Soluble Leishmania Antigen "ATSL" and the synthetic oligopeptides opH2A and opLiP2a. In the development of the rapid test; An approach was used to bind biotinylated oligopeptide to streptavidin as an anchor protein that binds to nitrocellulose, the pH and different solid nitrocellulose matrices (FF080HP, FF120HP and FF170HP from Whatman/GE) were also determined. The visible signal was tested with HRP-DAB, colloidal gold nanoparticles and gold nanoshell. The optimal conditions were obtained using the FF120HP nitrocellulose membrane, with a concentration of 200 µg/mL of streptavidin and 50 µg/mL of opH2A or opLiP2a; likewise, this assay presented a better detection sensitivity with gold nanoshell. In the case of the total antigen (ATSL), it was developed at a concentration of 500 µg/mL in the FF120HP matrix in colloidal gold. These conditions together for the antigens (opH2A, opLiP2a and ATSL) applied to the LFA strip, provided a result after 40 minutes. In the validation of

the LFA test, the visual score analysis of the evaluated antigens showed a better diagnostic profile for the opLiP2a oligopeptide, which reflected a sensitivity of 62.0% and specificity of 94.6% compared to opH2a, which has a sensitivity of 36.0 % and specificity of 93.5%, and was even better than the total antigen (ATSL), which has a sensitivity of 56.0% and a specificity of 90.2%; this analysis is confirmed when measured by relative intensity - percentage of positivity. Finally, the diagnostic characteristics of the oligopeptides (opLiP2a and opH2A) of the LFA test are similar to the ELISA test using the same antigens, corroborating with the Kappa test which gave a substantial agreement between LFA and ELISA.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, synthetic oligopeptides, Lateral flow Assay

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es causada por un protozoo parásito del género *Leishmania*, esta enfermedad se presenta a nivel mundial en tres formas principales: leishmaniasis cutánea (CL), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV), también conocida como kala-azar (OMS, 2018). En el Perú, se presenta dos formas clínicas: la leishmaniasis cutánea andina o “uta”, causada principalmente por *L. (Viannia) peruviana* y la leishmaniasis selvática cutánea y mucocutánea o “espundia” causada generalmente por *L. (Viannia) braziliensis* (Tejada, et al., 2001; Samir Cubas, et al., 2019). Entre el 2012 y el 2021, el Ministerio de Salud del Perú reportó 61838 casos confirmados, de los cuales aproximadamente el 93% (57392 casos) fueron cutáneos y el 7% (4446) fueron de la forma cutáneo-mucosa (MINSA, 2022). En particular la leishmaniasis cutánea representa un problema de salud pública que afecta sobre todo a poblaciones de escasos recursos; por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar e implementar pruebas de diagnóstico que cumplan con los criterios de sensibilidad, especificidad, accesibilidad y aplicabilidad en el campo.

En la actualidad, los principales métodos convencionales de diagnóstico de leishmaniasis incluyen el crecimiento y la observación microscópica del patógeno en muestras clínicas, la detección inmunitaria de proteínas del parásito con anticuerpos (por ejemplo, ELISA) y la identificación del ADN de *Leishmania sp.* mediante PCR. Sin embargo, estas tecnologías tradicionales tienen varias limitaciones porque presentan sensibilidad altamente variable (Bailey & Lockwood, 2007; Boggild, et al., 2007; de Vries, et al., 2015), reactividad cruzada

con otras infecciones (Goto & Lindoso, 2010), consumen mucho tiempo y requieren de condiciones especiales y de equipos costosos que muchas veces no está disponible en zonas rurales y endémicas (de Vries, et al., 2015; Gomes, et al., 2014; Salman, et al., 1999; Mitropoulos, et al., 2010).

En los últimos años, ha incrementado el uso de métodos basados en el ensayo de flujo lateral o Lateral Flow Assay (LFA), como herramientas de diagnóstico rápido para diferentes enfermedades infecciosas en los puntos de atención (POC) (Sharma, et al., 2015). Esta tecnología, llamado también ensayo inmunocromatográfico, es una prueba rápida de fácil ejecución e interpretación, de bajo costo, que no requiere instrumental de laboratorio sofisticado, ni personal altamente capacitado (Sajid, et al., 2015; Koczula & Gallotta, 2016), lo que supera las limitaciones prácticas de otros métodos basados en serología. En este sentido, se cuenta con pruebas rápidas en formato LFA, disponibles comercialmente para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral basado en la identificación de anticuerpos contra la proteína recombinante K39 en muestras de suero o sangre total; cuya sensibilidad y especificidad de la prueba se acercan al 95% (OPS, 2019). En el caso de leishmaniasis cutánea se tiene una prueba rápida basado en la detección de antígeno (proteína de secreción denominada tiorredoxina peroxidasa), sin embargo, esta herramienta está limitado a la detección de *L. major*, especie prevalente en el viejo mundo (Ben Salah, et al., 2014; Bennis, et al., 2018), hasta el momento no se encontró algún reporte basada en esta herramienta para el serodiagnóstico de leishmaniasis cutánea del nuevo mundo y más aún que utilicen oligopéptidos como antígeno.

Considerando las ventajas de la prueba de diagnóstico en formato LFA en los puntos de atención (POC). El presente estudio propone el desarrollo de tres pruebas rápidas en formato LFA que emplean independientemente antígeno total soluble (ATSL) de *L. braziliensis* y oligopéptidos derivados de la histona H2A (opH2A) y de la proteína ácida ribosomal P2a (opLiP2a) de *L. infantum*; previamente el oligopéptido opH2A en combinación con el oligopéptido opLiP2a fueron validados por el método de ELISA indirecto para el diagnóstico serológico de leishmaniasis cutánea y mostraron una buena sensibilidad y especificidad (Valdivia-Francia, 2018). Los antígenos (ATSL, opH2A y opLiP2a) se transferirán al formato LFA y se establecerán las condiciones que mejoren el rendimiento de la prueba rápida, utilizando un suero de control tanto positivo como negativo. Posteriormente, bajo las condiciones óptimas, la prueba LFA se evaluará como herramienta de diagnóstico visual a partir de un panel de sueros de pacientes positivos a leishmaniasis y voluntarios negativos (endémicos y no endémicos).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis sigue siendo una de las enfermedades tropicales más desatendidas y relacionadas con la pobreza del mundo. La forma clínica más común es la leishmaniasis cutánea (LC), se caracteriza por presentar lesiones principalmente en áreas expuestas como cara, brazos y piernas; en algunos casos puede curarse espontáneamente, y en otros llega a producir cicatrices graves y permanentes, lo que causa una estigmatización social en la persona quien presenta leishmaniasis (Savioli & Daumerie, 2010). Esta enfermedad es endémica en 98 países, principalmente en 10 países entre ellos Perú, registran el mayor número de casos, representando entre el 70% y el 75% de la incidencia mundial estimada. Anualmente se reportan más de 220.000 casos de leishmaniasis cutánea, aunque esta cifra es mucho menor de la real, esto por razones como, una búsqueda pasiva de casos, problemas de acceso al diagnóstico, falta de personal de salud en zonas rurales y el hecho que muchos países endémicos no reportan casos al no disponer de programas de notificación, vigilancia e investigación (Savioli & Daumerie, 2010; Alvar, et al., 2012).

Las herramientas de diagnóstico actualmente disponibles para la leishmaniasis se pueden dividir en tres grupos: parasitológicos, serológicos y moleculares, cada uno de los cuales presenta ventajas y desventajas. Entre los principales métodos de diagnóstico, se identificó como método estándar, la microscopía, sin embargo, para el Perú se reportó que la microscopía directa está sujeta a elevados diagnósticos inexactos (31%; IC 95%; 1,06-3,53) (Lamm, et al., 2018; Samir Cubas, et al., 2019). Por otro lado, los resultados de los diagnósticos convencionales de tipo serológico y molecular, pueden demorarse varias semanas

debido a cuestiones logísticas y operativas (de Paiva-Cavalcanti, et al., 2015); además, suele implicar más de una visita al centro médico, lo que es inviable para una población de escasos recursos que suele vivir lejos de él. Como consecuencia, muchas personas que podrían ser objeto de tratamiento permanecen sin diagnosticar y sin tratamiento.

En los últimos años, ha habido una explosión en el uso de ensayos rápidos. En particular, la facilidad de uso de los inmunoensayos de flujo lateral ha revolucionado el área de la asistencia sanitaria personal. Las pruebas de ensayo de flujo lateral se han convertido en el formato de elección para muchas situaciones de prueba, como embarazo, ovulación, uso de drogas (tanto terapéuticas como ilícitas), enfermedades infecciosas, salud ambiental e incluso en los mercados forenses y de biodefensa. La característica clave de una prueba de flujo lateral es que es muy simple para el usuario final. Normalmente, el usuario simplemente tiene que aplicar la muestra y la prueba se ejecutará en cuestión de minutos. Una tira reactiva de LFA se compone típicamente de un respaldo de plástico con un adhesivo, una almohadilla de muestra, una almohadilla de conjugado, una membrana y una almohadilla absorbente (Koczula & Gallotta, 2016). También hay un conjugado de anticuerpos, tampones y agentes bloqueantes. Elegir los materiales de fase sólida compatibles y aplicar los componentes biológicos de una manera que resulte en un ensayo sensible y estable puede ser un desafío importante.

Un aspecto a considerar en el desarrollo de una prueba en formato LFA es la inmovilización de moléculas diana (antígenos) en la membrana de nitrocelulosa, ya que representa un paso importante, para aumentar la sensibilidad de la tira de

prueba de flujo lateral al detectar los analitos de interés. Para este trabajo se tiene como candidatos a fijar el antígeno total (ATSL) y los oligopéptidos opH2A y opLiP2a, en cuanto a los oligopéptidos enfrentan dificultades al interactuar con la matriz sólida, debido a su tamaño, sin embargo, se han reportado algunas estrategias en el uso de oligopéptidos en LFA para el diagnóstico de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias (los péptidos fueron conjugados con BSA) (Kulabhusan, et al., 2017; Yonekita, et al., 2013; Gonzales-Moa, et al., 2018). En base a lo descrito, el presente trabajo se plantea las siguientes preguntas: ¿La fijación por adsorción directa del ATSL en nitrocelulosa, puede ser una mejor opción para su captura en nitrocelulosa? ¿Los oligopéptidos biotinilados podrían aprovechar su interacción con estreptavidina para su inmovilización en nitrocelulosa?

Otro aspecto importante en el desarrollo de la prueba rápida son las moléculas marcadas que permiten la detección del inmunocomplejo formado en la tira reactiva. El oro coloidal es quizás la etiqueta más utilizada hoy en día en inmunoensayos comerciales de flujo lateral por muchas razones. Es bastante fácil y económico prepararlo en el laboratorio. El color es intenso y no se necesita ningún proceso de desarrollo para la visualización. Existe un gran cuerpo de protocolos en la literatura para su conjugación y aplicaciones. La etiqueta es muy estable en forma líquida o seca y no se blanquea después de la tinción en las membranas (Chun, 2009). También hay una variedad de otras etiquetas (ejemplo: partículas magnéticas y de látex) y métodos de mejora que están en desarrollo para su uso en los ensayos de punto de necesidad (O'Farrell, 2009).

En el 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo un conjunto de siete criterios que idealmente debería cumplir una prueba de diagnóstico de POC para ser útil en un entorno de recursos limitados (Chavali & Ramji , 2018). Estas pautas se conocen como los criterios ASSURED que establecen que un dispositivo debe ser asequible, sensible y específico (pocos falsos negativos y falsos positivos, respectivamente), fácil de usar, rápido y robusto, libre de equipos (por ejemplo, no requieren refrigeración) y se entregan fácilmente (accesibles a los usuarios finales) (Kim, et al., 2019). El ensayo de flujo lateral (LFA) es el único formato de diagnóstico rápido que cumple con los criterios ASSURED, como se demuestra en las pruebas desarrolladas para diferentes enfermedades infecciosas (Sharma, et al., 2015), entre ellos el diagnóstico de la leishmaniasis visceral basado en la identificación de anticuerpos contra la proteína recombinante K39 en muestras de suero o sangre total; cuya sensibilidad y especificidad de la prueba se acercan al 95% (OPS, 2019). En general para esta forma clínica se han reportado pruebas rápidas de diagnóstico que utilizan diferentes antígenos de *Leishmania* y que mostraron incluso mejores resultados que la proteína K39 (Ejazi, 2019). En el caso de leishmaniasis cutánea americana, no existen pruebas en formato LFA y más aún, que tengan como principio la detección de anticuerpos anti-leishmania. Si bien, uno de los elementos clave en la producción de LFA son la sensibilidad y especificidad, estos en general dependen del antígeno utilizado (Elmahallawy, et al., 2014; Reimão, 2020), además de los aspectos mencionados (inmovilización del antígeno y la molécula marcada). Considerando que los oligopéptidos opH2A y opLiP2a mostraron previamente una sensibilidad de 82.04% y especificidad de 98.67% por análisis combinatorio

de ambos péptidos, bajo el formato de ELISA indirecto (Valdivia-Francia, 2018).
Entonces ¿Es posible que el ATSL y los oligopéptidos (opH2A y opLiP2a) puedan implementarse al formato *Lateral Flow Assay*, como herramienta de serodiagnóstico de leishmaniasis?

III. MARCO TEÓRICO

3.1. El parásito *Leishmania* spp.

El agente etiológico de la leishmaniasis es un protozoo que se presenta en dos estadios: (i) Promastigote o estadio flagelado y (ii) Amastigote, este parásito del género *Leishmania* (reino *Protista*, subreino *Protozoa*, orden *Kinetoplastida* y familia *Trypanosomatidae*) se caracteriza por la presencia de un kinetoplasto, el cual es una forma única de ADN mitocondrial (Sánchez-Saldaña, et al., 2004).

Alrededor de 21 especies de *Leishmania* spp. han sido descritas como patógenas para los seres humanos, las mismas que pueden ser clasificadas en dos subgéneros en función de su desarrollo en el tubo digestivo del insecto vector: *Leishmania*, en la porción del tubo digestivo anterior al píloro, que se encuentra en la unión del intestino medio con el intestino posterior (desarrollo suprapilórico), y *Viannia*, en el intestino medio como en el intestino posterior (desarrollo peripilórico). El subgénero *Leishmania* está presente en el Viejo mundo y se compone de varias especies o complejos de especies (complejo de *L. donovani*, complejo de *L. mexicana*, *L. major*, *L. tropica*, etc) mientras que el subgénero *Viannia* está presente en el Nuevo mundo y comprende especies del complejo de *L. braziliensis* (*L. braziliensis*, *L. peruviana*), y el complejo de *L. guyanensis* (*L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. lainsoni*, etc) (Sánchez-Saldaña, et al., 2004; Hide, et al., 2006).

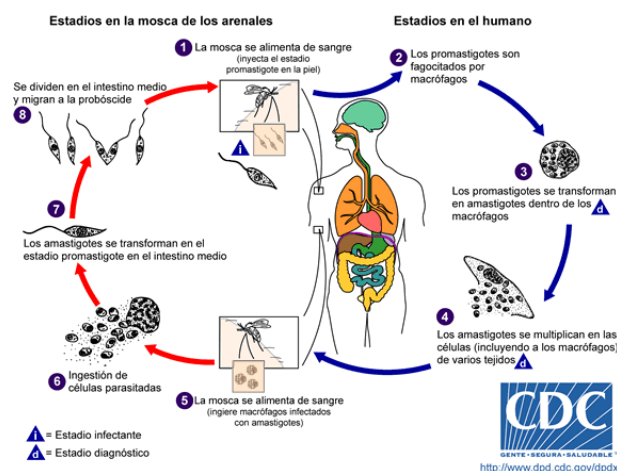
El parásito *Leishmania* sp. puede existir bajo dos formas diferentes en sus huéspedes, donde se reproduce de forma asexual por fisión binaria: como una forma promastigote extracelular, alargada, con un núcleo central, kinetoplasto terminal, y flagelo bien desarrollado en el insecto vector y como una forma

amastigote intracelular, redondeada, de 2.5 a 5.0 por 1.5 a 2.0 μm de diámetro, con un núcleo, kinetoplasto, y “bolsillo flagelar” con los rudimentos de un flagelo en los monocitos y macrófagos del hospedero vertebrado (Ashford, 2000).

3.1.1. Ciclo biológico de *Leishmania*

Los parásitos *Leishmania* tienen un ciclo biológico digenético que comprende un vector invertebrado del género *Phlebotomus* (Viejo Mundo) o *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) y un hospedero vertebrado. En los hospederos vertebrados los parásitos se encuentran en el estadio amastigote dentro de los macrófagos, donde se reproducen por fisión binaria. Cuando el mosquito vector hembra pica en la dermis del hospedero, succiona los amastigotes y cuando éstos llegan a la luz del tubo digestivo del vector se transforman rápidamente a promastigotes, la forma móvil del parásito. En el vector, los promastigotes procíclicos se transforman en promastigotes metacíclicos infectivos. Estos se trasladan a la probóscide del mosquito en donde están listos para ser transmitidos al hospedero vertebrado para continuar con el ciclo (Reithinger, et al., 2007) (Figura N° 1).

Figura N° 1: Ciclo biológico de *Leishmania*



Fuente: CDC, 2010.

3.2. Leishmaniasis

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades causadas por el parásito protozooario *Leishmania*, esta enfermedad endémica afecta sobre todo a las poblaciones más pobres del planeta, se calcula que los casos nuevos al año oscilan entre 700 000 y 1 millón (OMS, 2018).

3.2.1. Formas clínicas

La leishmaniasis se caracteriza por afectar la piel, mucosas y vísceras, dependiendo de la especie de *Leishmania* y la respuesta inmune del huésped entre otros factores (Sánchez-Saldaña, et al., 2004). En el hombre, la enfermedad se presenta en al menos 3 formas clínicas: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral.

- **Leishmaniasis cutánea (LC):** Se caracteriza por el desarrollo de una o más lesiones ulcerativas en el sitio de infección que pueden curar espontáneamente y en algunos casos se pueden observar lesiones satélites próximas a la lesión original. La LC es causada por las especies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. naiffi*, *L. venezuelensis*, *L. lainsoni* y *L. shawi* en el Nuevo Mundo y *L. major*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. arabica*, y *L. gerbilli* en el Viejo Mundo; incluso otras especies como *L. donovani* y *L. infantum* también se han aislado a partir lesiones cutáneas. La leishmaniasis cutánea difusa (LCD), es una variante anérgica de la LC causada principalmente por *L. amazonensis* y *L. aethiopica*. Se caracteriza por el desarrollo de lesiones nodulares no-ulcerativas que se diseminan por todo el cuerpo asemejando a la

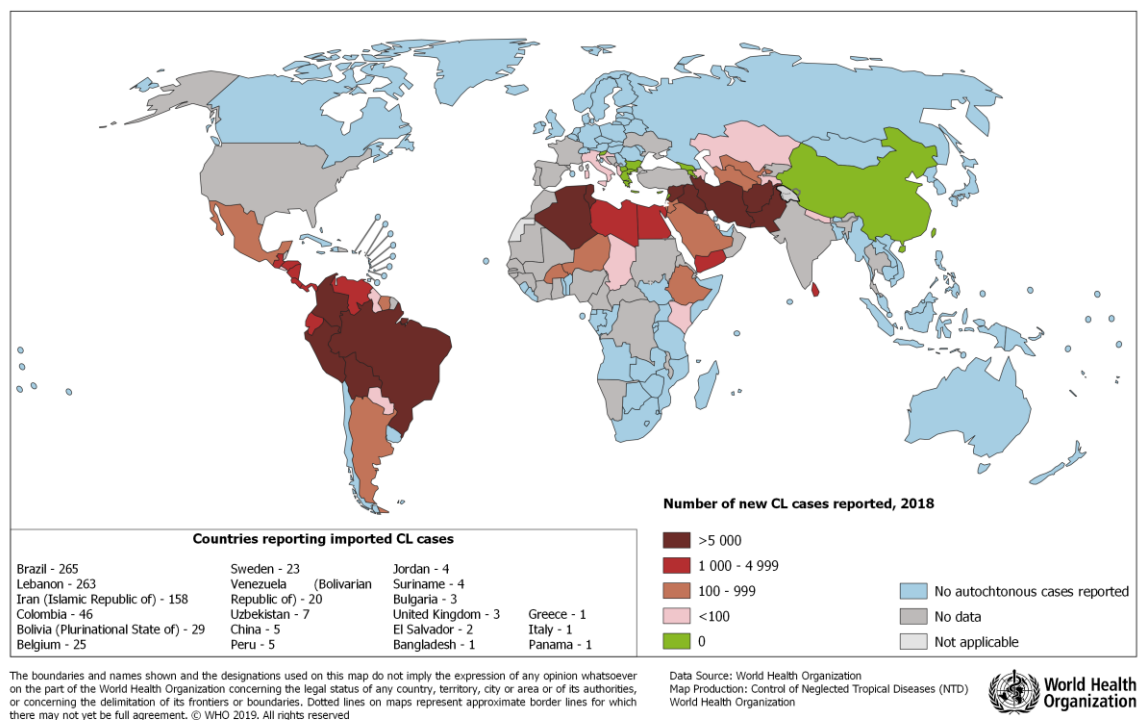
lepra. Por lo general, éstas lesiones nunca curan espontáneamente y el paciente tiende a recaer después del tratamiento (Hide, et al., 2006).

Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniasis cutánea se registran en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia central (Figura N° 2).

- **Leishmaniasis mucocutánea (LMC):** También conocida como “espundia” se produce por la diseminación linfática o hematógena de los parásitos a las membranas mucosas o en algunos casos por la extensión directa de lesiones cutáneas cercanas (Choi & Lerner, 2001). La infección es causada por *L. braziliensis* y menos frecuentemente por el complejo de *L. guyanensis*, las cuales generan lesiones que pueden conducir a la destrucción extensa y desfigurante de los tejidos mucosos de la nariz, boca y cavidades de la garganta. El cincuenta por ciento de los pacientes desarrollan lesiones mucocutáneas dentro de los 2 años de las lesiones cutáneas iniciales, y el 90% dentro de los 10 años (Choi & Lerner, 2001), pero en algunos casos puede coincidir con lesiones cutáneas activas. La desnutrición y la neumonía son las principales causas de muerte en pacientes con LMC.
- **Leishmaniasis visceral (LV):** Es una enfermedad sistémica causada por la diseminación de especies del complejo de *L. donovani* que consiste principalmente en *L. (d) infantum*, *L. (d) donovani* y *L. (d) chagasi*. Constituye la forma más grave de la enfermedad ya que tiene una tasa de mortalidad de casi el 100% si no se trata. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso sustancial, hinchazón del bazo y el hígado, y anemia. La LV causada por *L. infantum* afecta principalmente a niños. La leishmaniasis cutánea post-kala-azar

(PKDL) es una secuela de la LV que puede aparecer varios meses o años después de la cura completa de la infección visceral bajo la forma de erupciones maculopapulares-nodulares hipo- o hiperpigmentadas en la piel. También se han reportado casos sin historia previa de LV (Ashford, 2000).

Figura N° 2: Estado de endemidad de la leishmaniasis cutánea a nivel mundial, 2018



Fuente: (OMS, 2018)

3.2.2. Leishmaniasis en el Perú

Esta enfermedad afecta principalmente a la población andina y selvática de escasos recursos, está distribuida en 21 regiones del Perú donde se encuentra presente el vector de la enfermedad, el mosquito del género *Lutzomyia* sp. Entre el 2012 y el 2021, el Ministerio de Salud (MINSA) del Perú reportó 61838 casos confirmados, de los cuales aproximadamente el 93% (57392 casos) fueron cutáneos y el 7% (4446) fueron de la forma cutáneo-mucosa. Las regiones de

Cusco, Madre de Dios, Cajamarca, Piura, Junín, Loreto y San Martín, presentaron más del 70 % de los casos reportados a nivel nacional (MINSA, 2022).

En el Perú, la leishmaniasis cutánea andina o “uta”, causada principalmente por *Leishmania (Viannia) peruviana*, está distribuido en los valles interandinos ubicados entre los 800 y 3000 msnm, y la leishmaniasis selvática cutánea y mucocutánea o “espundia” causada generalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, presente en la selva alta y toda la llanura amazónica ubicadas por debajo de los 1800 msnm (Tejada, et al., 2001; Samir Cubas, et al., 2019).

3.3. Métodos de diagnóstico de leishmaniasis

Los métodos actuales para diagnosticar la leishmaniasis se limitan principalmente a hospitales de referencia o centros de investigación con entornos de laboratorio bien equipados. Por lo tanto, existe la necesidad de simplificar y adaptar los ensayos de diagnóstico en áreas endémicas (Akhoundi, et al., 2017). Desde el descubrimiento del agente etiológico, se han desarrollado varias pruebas diagnósticas, sin embargo, ninguno de los exámenes disponibles en la actualidad puede considerarse el estándar de oro. Algunas metodologías de diagnóstico convencional, con sus respectivas limitaciones, se mencionan a continuación:

3.3.1. Métodos parasitológicos de diagnóstico.

El principal diagnóstico de histopatología permite observar amastigotes de *Leishmania* en secciones de tejido, los cuales se caracterizan por tener una forma redonda u ovalada de aproximadamente 2-4 μm (de Vries, et al., 2015; Elmahallawy, et al., 2014; Mehregan, 1999). El citoplasma del amastigote se tiñe de color azul pálido con tinción de Giemsa, Wright, Feulgen, Romanovski, o de

azul-grisáceo pálido con tinción con hematoxilina y eosina (Mehregan, 1999). El kinetoplasto, en forma de barra, y el nucléolo tienen un diámetro menor a 1 μm y se tiñen de un púrpura-rojizo (Mehregan, 1999).

Los métodos parasitológicos son los diagnósticos más favorecidos y de primera línea para determinar la enfermedad; sin embargo, una limitante es que requiere de experiencia técnica para identificar correctamente del parásito (Bailey & Lockwood, 2007). Asimismo, la sensibilidad de la prueba es altamente variable. En el Viejo Mundo, la sensibilidad varía entre un 50-70%; sin embargo, en el Nuevo Mundo, estos valores se ven reducidos considerablemente a un 15-30% (Goto & Lindoso, 2010). En el Perú el diagnóstico por tinción Giemsa del frotis de pacientes con LC ha registrado sensibilidades de 59.6% y 71.4% con un promedio entre 1-10 amastigotes presentes en la lesión (Boggild, et al., 2010; Boggild, et al., 2010).

3.3.2. Métodos moleculares

Las técnicas moleculares sirven como complemento y como método alternativo de diagnóstico. La principal razón para la aprobación de las técnicas moleculares en los laboratorios de rutina en todo el mundo es la viabilidad, la seguridad y confiabilidad. Aunque se han desarrollado varios métodos moleculares de diagnóstico, los ensayos basados en reacciones en cadena de la polimerasa constituyen actualmente la principal vía de diagnóstico molecular para profesionales e investigadores de la salud (Thakur, et al., 2020). Estudios realizados en Perú para el diagnóstico de LC reportan sensibilidades 92.1% y

96.9% en comparación con diagnóstico por cultivo tradicional (Boggild, et al., 2010; Boggild, et al., 2010; Boggild, et al., 2007).

Los métodos moleculares son aún más sensibles y son una técnica poderosa que proporciona una detección temprana de los parásitos. Se han implementado con éxito muchos métodos moleculares para el diagnóstico de leishmaniasis, pero la técnica se usa principalmente en laboratorios de investigación, y su aplicación en prácticas clínicas e instalaciones de salud requiere personas capacitadas que generalmente no están disponibles en países pobres y en desarrollo. En comparación con otras técnicas de diagnóstico, los enfoques moleculares siguen siendo costosos y requieren conocimientos técnicos (Thakur, et al., 2020).

3.3.3. Métodos inmunológicos de diagnóstico.

Existen muchas pruebas serológicas para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea. Entre estos podemos citar el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA), el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la inmunotransferencia (Western blot). La sensibilidad de estas pruebas serológicas depende principalmente del ensayo y su metodología, mientras que la especificidad depende del antígeno y no del formato serológico utilizado (Elmahallawy, et al., 2014), estas pruebas suelen tener resultados negativos dentro de los 3 meses posteriores al inicio de la forma cutánea de la enfermedad. Las pruebas IFA y ELISA son consideradas altamente sensibles por la mayoría de los estudios, alcanzando valores superiores al 90% (Reis, et al., 2008; Szargiki , et al., 2009; Pomares, et al., 2012). Las pruebas IFA, ELISA y Western blot tienden a ser más sensibles en las infecciones causadas por *L. (V.) braziliensis* en comparación con

las enfermedades causadas por *L. (L.) amazonensis* (Szargiki , et al., 2009; Gomes, et al., 2014).

3.3.3.1. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Se han desarrollado técnicas de ELISA para el serodiagnóstico de LC, la mayoría de ellas basadas en el empleo del antígeno total soluble de promastigote de *Leishmania sp.* (ATSL). La variedad de antígenos disponibles en el ATSL aumenta la probabilidad de obtener un mayor reconocimiento de anticuerpos antileishmania presentes en el suero de pacientes; de esta manera se favorece la sensibilidad diagnóstica de la técnica de ELISA. Sin embargo, esta amplia variedad de antígenos disponibles en el ATSL afecta en la especificidad de la técnica de diagnóstico, al dar reactividad cruzada con otras infecciones similares, como la enfermedad de Chagas, malaria, ciertas micosis, etc. (Silvestre, et al., 2009; Szargiki , et al., 2009; Celeste, et al., 2014; Manetti-Skraba, et al., 2014; Yoneyama, et al., 2007).

Considerando las desventajas en el uso de ATSL como antígeno para la técnica de ELISA, en los últimos años se han identificado técnicas de serodiagnóstico basadas en el uso de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos (Costa, et al., 2012; Faria , et al., 2011; Menezes-Souza , et al., 2015; Celeste, et al., 2014). Por ejemplo, la especificidad y sensibilidad de ELISA usando HSP83 recombinante, mostró mejores resultados en comparación con el uso de antígenos crudos de *L. major* para diagnosticar una forma cutánea de la enfermedad, además de mucocutánea y VL (Al-Salem, et al., 2014). Aunque ELISA es una técnica con una mayor especificidad y sensibilidad, tiene algunas limitaciones que incluye

alto consumo de tiempo y trabajo, la necesidad de profesionales especializados, equipos sofisticados, siendo su uso limitado en regiones endémicas (Elmahallawy, et al., 2014; Reimão, 2020).

3.4. Antígenos inmunogénicos para el diagnóstico de leishmaniasis

3.4.1. Histonas

Las histonas son un grupo de proteínas (H2A, H2B, H3 y H4) de bajo peso molecular y alto contenido en lisina y arginina, que se asocian al ADN de todas las células eucariotas para formar la cromatina (Luger, et al., 1997). La histona enlazadora H1 se une a los sitios de entrada/salida de ADN en la superficie del centro nucleosomal y completa el nucleosoma (Galanti, et al., 1998; Sullivan, et al., 2006).

La caracterización de los genes que codifican las histonas de los tripanosomátidos, revela un alto grado de variabilidad en la secuencia de las histonas de estos protozoos en relación a las histonas de eucariotas superiores (Galanti, et al., 1998). La divergencia entre las secuencias predomina hacia los dominios N-terminal de las secuencias, los cuales están sujetos a cambios postraduccionales (Soto, et al., 1995; Soto, et al., 2003).

Estudios realizados por Muller y colaboradores en 1986 identificaron 11 regiones antigénicas de la proteína H2A, indicando que, virtualmente toda la proteína H2A posee actividad antigénica (Muller, et al., 1986). En relación a la actividad antigénica de la histona H2A en enfermedades, se encontraron anticuerpos específicos a H2A en suero de pacientes con lupus (Rubin, et al., 1982). Estudios posteriores demostraron que la proteína de histona H2A proveniente de *L.*

infantum reacciona con la respuesta inmune humoral ante la infección por LV en perro. Se identificaron distintos epítomos, en las regiones N-terminal y C-terminal de la Histona H2A, los cuales eran altamente antigénicos y fueron evaluados contra sueros de LV (Soto, et al., 1995). En específico la secuencia del péptido denominado como opH2A de *L. infantum* muestra una identidad del 91.67% con la secuencia de *L. braziliensis* (Valdivia-Francia, 2018).

3.4.2. Proteína ribosomal

La subunidad ribosomal mayor 60S, contiene un pedúnculo ribosomal que está involucrado en la unión de los factores de traducción (Liljas, 1982). Esta subunidad, posee varias copias de las proteínas P (Requena, et al., 2000; Tchórzewski, 2002), las cuales han sido clasificadas de acuerdo a su homología con las proteínas de mamíferos P1, P2 y P0 (Tchórzewski, 2002). Varias enfermedades en las que se encuentra involucrado el sistema inmunológico han sido asociadas con las proteínas P. El ejemplo más importante es la respuesta autoinmune contra las proteínas P ribosomales, que aparece casi exclusivamente en la enfermedad de lupus (Rubin, et al., 1982). Estudios más recientes han encontrado que las proteínas P también pueden ser detectadas en infecciones parasitarias con *T. cruzi* y *Leishmania spp.* (Skeiky, et al., 1994).

En los estudios con sueros de canes se determinó que tanto las proteínas P (P0, P2a y P2b) como epítomos lineales de las histonas de *L. infantum* eran capaces de reaccionar indicando la presencia de LV (Soto, et al., 1995). El mapeo epitópico de la proteína acida ribosomal P2a de *L. infantum* permitió identificar las regiones inmunogénicas, siendo la secuencia (E/A)AKK(E/D)EPEEE(E/-)A el

determinante antigénico presente tanto en P2a como P2b, ubicado junto a la región conservada C-terminal (Soto, et al., 1995). Posteriormente se probó si la proteína P, específicamente LiP2a, podía reaccionar con suero de pacientes humanos con LMC y LV. Se observó que los antígenos LiP2a reaccionaron con una sensibilidad del 50% para pacientes con LV y 76% para pacientes con LMC y con una reactividad 100% específica (Soto, et al., 1996). En el alineamiento de la secuencia del péptido opLiP2a de *L. infantum* y la secuencia ortóloga en *L. braziliensis*, muestra una identidad del 70% (Valdivia-Francia, 2018).

3.4.3. Otros antígenos

El cribado de una biblioteca de expresión de *L. chagasi* con sueros de pacientes de *L. donovani* permitió la caracterización de un antígeno, rK39, que mostraba homología de secuencia con la superfamilia de proteínas motoras de la quinesina (Burns, et al., 1993).

En el 2014 se realizó un estudio en el que se mapearon los epítomos de la proteína HSP83 de *L. braziliensis* con el fin de determinar nuevos blancos para el diagnóstico de LTA y LV. Mediante herramientas bioinformáticas se identificaron epítomos lineales de células B que se encuentran conservadas en *Leishmania* pero que son divergentes de sus hospederos: *Homo sapiens* y *Canis familiaris*, y del parásito *T. cruzi*, para seleccionar potenciales blancos para el inmunodiagnóstico de leishmaniasis. Se encontró que 3 péptidos: péptido 1 (EEDESKKKSCGDEGEPKVE), péptido 2 (VTEGGEDKKK) y péptido 3 (EVAEAPPAEAAPA) presentaron una alta sensibilidad en el diagnóstico de

leishmaniasis mediante ELISA y alta especificidad para discriminarla entre otras infecciones (Menezes-Souza , et al., 2015).

3.5. Ensayo de flujo lateral (LFA)

La tecnología de flujo lateral es la plataforma de pruebas de diagnóstico rápido más simple y exitosa derivada de la prueba de aglutinación de látex desarrollada por Singer y Plotz en 1956. Desde su introducción, la tecnología y sus aplicaciones en diversos campos, ha seguido evolucionando. Su notable crecimiento global se puede atribuir a numerosos factores, incluida la necesidad de una detección temprana de enfermedades como el cáncer, la demanda continua de herramientas de detección para el manejo preventivo de enfermedades infecciosas y la necesidad de dispositivos rentables con poco o ningún mantenimiento (Sharma, et al., 2015).

3.5.1. Principio de un ensayo de flujo lateral (LFA)

El ensayo de flujo lateral (LFA), denominado también inmunoensayo de flujo lateral (LFIA), se basa en el uso de una membrana de nitrocelulosa, polímero, papel u otro sustrato compuesto que facilita la separación, captura y detección de los analitos diana de interés. Los diversos componentes de un LFA tienen la capacidad de transportar líquido, incluida la sangre o el suero, bajo la acción capilar (Sharma, et al., 2015).

Hay varios formatos para ensayos de flujo lateral. En un formato de captura simple, el analito objetivo de la muestra interactúa con un anticuerpo marcado, ya precargado en la tira, y migra hacia arriba hasta que encuentra otro anticuerpo específico del objetivo, que está inmovilizado en la tira. El anticuerpo de captura

marcado con antígeno es entonces evidente como una línea que se puede ver a simple vista o se puede medir usando un detector. También está presente un control que usa un anticuerpo no específico y la presencia de la línea asociada demuestra claramente que el ensayo está funcionando correctamente. También son posibles otros formatos, por ejemplo, ensayos competitivos, y pueden ser particularmente relevantes cuando el analito diana no posee múltiples epítomos para la unión de anticuerpos (Posthuma-Trumpie, et al., 2009).

En la práctica, el sistema funciona de la siguiente manera. Brevemente, se introduce una muestra en la almohadilla de muestra a través de la ventana de aplicación de muestra presente en la carcasa de plástico. La muestra migra a través de la almohadilla de muestra a la almohadilla de conjugado, donde el elemento de reconocimiento (antígeno/anticuerpo) ya está disponible en forma seca. Aquí, el analito objetivo interactúa con el elemento de reconocimiento marcado seco y el complejo resultante migra más al siguiente segmento de la LFIA. En este segmento, la matriz de reacción, consta de una membrana hidrófoba de nitrocelulosa o acetato de celulosa donde se han inmovilizado anticuerpos o antígeno anti-diana (según el tipo de formato) en un formato de línea o banda a través de la membrana para actuar como zona de captura para el conjugado etiquetado. A esto le sigue la presencia de otra zona, la zona de control, que comprueba la funcionalidad del ensayo. Los reactivos, tampones y fluidos de ensayo superfluos migran aún más hacia la almohadilla absorbente y se absorben como desechos. (Sajid, et al., 2015).

3.5.2. Componentes de biorreconocimiento

La alta especificidad y selectividad del elemento de biorreconocimiento son clave para el desempeño del ensayo.

3.5.2.1. Almohadilla de aplicación de muestra

La celulosa, la fibra de vidrio, el rayón o la sílice reticulada son materiales comunes que se utilizan para fabricar almohadillas de aplicación de muestras. La función principal de la almohadilla de muestra es permitir una migración continua y uniforme de la muestra a la almohadilla de conjugado, al tiempo que hace que la muestra sea compatible con los demás componentes del sistema de prueba. Por lo general, esto se logra mediante el tratamiento previo de la muestra mediante la separación del plasma o suero de la sangre completa y puede implicar la captura de eritrocitos y otras células, el ajuste del pH y la eliminación de interferencias, para permitir una interacción eficiente del analito diana con anticuerpos y conjugados (Sharma, et al., 2015). La inmersión de la almohadilla ocurre como parte del pretratamiento de la almohadilla, donde las almohadillas se impregnan con un tampón de ensayo que contiene tampón de pH, tensioactivos, reactivos de bloqueo (si es necesario), aditivos y otros reactivos para aumentar la sensibilidad del ensayo. En algunos casos, la almohadilla de muestra y la almohadilla conjugada pueden ser la misma unidad, aunque esto no es común. Típicamente, el conjugado y el tampón de ensayo no son compatibles. Sin embargo, no es inusual ver en algunos ensayos el mismo material que se usa para la almohadilla de muestra y la almohadilla conjugada, aunque las almohadillas se tratan individualmente y posteriormente se ensamblan (O'Farrell, 2009).

3.5.2.2. Almohadilla conjugada

La muestra migra de la almohadilla de muestra a la almohadilla de conjugado donde se mezcla con los conjugados secos (por ejemplo, anticuerpos específicos del analito diana marcados con una etiqueta). Las almohadillas conjugadas generalmente están hechas de fibras de vidrio o poliésteres y, a menudo, se tratan previamente con diferentes proteínas, polímeros y tensioactivos para hacerlas hidrófilas con el fin de garantizar la estabilidad y la liberación óptima del conjugado. El material que compone una almohadilla de conjugado a menudo juega un papel vital en la determinación de la vida útil general de la prueba LFIA al garantizar la estabilidad de los anticuerpos, las etiquetas y los conjugados asociados, y al permitir la liberación de los conjugados de la almohadilla (Posthuma-Trumpie, et al., 2009). Durante la fabricación, los conjugados se dispensan sobre la almohadilla utilizando un dispensador cuantitativo como el BioDot AirJet Quanti para mantener la dispensación uniforme y, por tanto, la reproducibilidad de los componentes. Los altos niveles de control y la dispensación precisa de reactivos son vitales para un buen rendimiento. Las variaciones en la mezcla, deposición o liberación del conjugado de la almohadilla dan como resultado desviaciones significativas en el rendimiento del ensayo (Sharma, et al., 2015).

3.5.2.3. Membrana

Se encuentra disponible comercialmente una amplia variedad de tipos de membranas y tamaños de poros. La selección de la membrana depende del analito y la aplicación de la prueba. Por lo general, se utilizan membranas hidrófobas de

nitrocelulosa (alta unión a proteínas), fibra de vidrio (no unión a proteínas) o acetato de celulosa (baja unión a proteínas) para LFIA. Las membranas de nitrocelulosa son los materiales más ampliamente aceptados que se han aplicado eficazmente para las pruebas LFIA debido a sus características distintivas que incluyen alta afinidad por las proteínas, facilidad de humectación, falta de interferencia con el ensayo, costo relativamente bajo, disponibilidad comercial de varias versiones de nitrocelulosa, verdadero características de flujo capilar y facilidad de manejo comparativa. El área de reacción se compone de dos líneas o zonas en la membrana de nitrocelulosa, conocido como la prueba (o captura) y líneas de control. La línea de captura consta de un antígeno o anticuerpos específicos inmovilizados para capturar el analito diana, mientras que la presencia de la línea de control confirma el flujo adecuado del líquido o el rendimiento del ensayo. Varios factores, incluida la dispensación precisa de componentes biológicos y el bloqueo y secado adecuados, juegan un papel clave en el refinamiento de la sensibilidad del ensayo (Sharma, et al., 2015).

Otro aspecto a considerar en el desarrollo de una prueba en formato LFA es la inmovilización de moléculas diana (antígenos) en la membrana de nitrocelulosa, ya que representa un paso importante, para aumentar la sensibilidad de la tira de prueba de flujo lateral al detectar los analitos de interés. Se reportaron tres métodos para inmovilizar proteínas en la membrana de nitrocelulosa, que incluyen la adsorción física de la molécula diana a la membrana, la unión covalente y la inmovilización mediante enlace de afinidad como la interacción estreptavidina-biotina (Benore, et al., 2010; Koczula & Gallotta, 2016). No obstante, el método de inmovilización más común ha sido la adsorción física directa, el éxito de este

método se debe en gran medida a la idoneidad de los anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) para este proceso, que han sido la base de los agentes de captura para los inmunoensayos de flujo lateral (O'Farrell, 2009). Sin embargo, como los nuevos ensayos basados en la tira reactiva están diseñados con moléculas distintas de IgG, el método probado y verdadero de adsorción directa puede dejar de servir como el método más efectivo para la inmovilización (Holstein, et al., 2016). En el caso de la unión covalente puede interferir total o parcialmente con la función de la proteína diana (Chan, et al., 2007). La inmovilización a través del enlace de afinidad como la interacción estreptavidina-biotina es muy eficaz para orientar las proteínas inmovilizadas sobre la superficie de la membrana (Chivers, et al., 2011).

3.5.2.4. Almohadilla absorbente

La almohadilla absorbente, está diseñado para extraer todo el líquido agregado a la tira en esta región y retenerlo durante la duración del ensayo. No debe liberar este líquido nuevamente en el ensayo o pueden producirse falsos positivos (O'Farrell, 2009).

3.5.2.5. Materiales de respaldo para la membrana

Para facilitar el manejo y proporcionar resistencia a las frágiles membranas utilizadas en el sistema LFIA, todos los lechos capilares suelen estar montados sobre un material de respaldo. Los materiales utilizados para proporcionar la rigidez requerida son típicamente poliestireno o diferentes variantes de plástico que se recubren con un adhesivo sensible a la presión para mantener todos los componentes juntos en un formato definido. La compatibilidad de las proteínas

con los adhesivos durante un largo período de tiempo juega un papel importante en el mantenimiento de la vida útil prescrita del producto. El respaldo sirve como soporte estructural para el sistema LFIA al que se laminan varias capas (por ejemplo, almohadillas) que realizan diferentes funciones y toda la entidad se aloja en un solo casete (Sharma, et al., 2015).

3.5.2.6. Etiqueta de detección

Etiquetas como perlas de látex, carbono coloidal, oro coloidal, etiquetas fluorescentes, enzimas, estreptavidina o nanopartículas de oro, se conjugan con un anticuerpo o un antígeno según el formato del sistema LFIA (Xu, et al., 2009; Berlina, et al., 2013; Juntunen, et al., 2012). Varias formas de perlas de látex acopladas con tintes de color, tintes fluorescentes o elementos magnéticos están disponibles comercialmente y se pueden unir covalente o electrostáticamente con las proteínas. La presencia de etiquetas de colores evita la necesidad de costosos detectores y permite la detección visual del analito objetivo. La capacidad de acoplar perlas de látex con diferentes colores puede permitir la detección de múltiples analitos en una sola membrana de prueba. La evolución de los nanomateriales ha mejorado enormemente la sensibilidad de estos ensayos. Las propiedades inherentes de las nanopartículas de oro, incluidas las fuertes propiedades ópticas (color intenso) y el tamaño más pequeño de las partículas de oro (20 a 40 nm) en comparación con las perlas de látex (100 a 300 nm) las convierten en buenos candidatos para mejorar la sensibilidad y, por lo tanto, para aplicación en sistemas LFIA. La intensidad del color de las nanopartículas de oro es mucho mayor que la de las partículas de látex coloreadas, lo que proporciona una mejor discriminación de los positivos de bajo nivel en un ensayo. Varios otros

nanomateriales, incluidos los iones de plata en nanopartículas de oro, se han integrado en los LFIA para mejorar aún más la sensibilidad del sistema. En la situación ideal, el ensayo puede detectar múltiples analitos. Esto se puede lograr ejecutando múltiples carriles en una franja en paralelo con sitios de detección individuales. Alternativamente, los códigos de barras son posibles con diferentes etiquetas que demuestran la presencia de diferentes analitos. Son posibles muchos formatos diferentes, pero en entornos con recursos limitados la simplicidad en el uso, la sensibilidad y la especificidad son claves. proporcionando así una mejor discriminación de los positivos de bajo nivel en un ensayo. Varios otros nanomateriales, incluidos los iones de plata en nanopartículas de oro, se han integrado en los LFIA para mejorar aún más la sensibilidad del sistema (Sharma, et al., 2015).

3.5.3. Prueba de diagnóstico rápido de leishmaniasis

La primera prueba inmunocromatográfica de flujo lateral (ICT) se basó en un antígeno recombinante de 39 aminoácidos repetidos de *L. chagasi* (rK39) y se consideró un avance potencial que permitía un diagnóstico rápido y fácil de usar para el usuario y el paciente en los POC (Sundar, et al., 1998). Las ICT que utilizan el antígeno rK39 son ampliamente utilizadas en el diagnóstico de LV, sin embargo, su sensibilidad y especificidad pueden variar según el producto y el origen del paciente, como se demuestra en estudios con pacientes de diferentes áreas endémicas de Brasil, España, África Oriental y Sudeste Asiático (Boelaert, et al., 2008; Maia, et al., 2012; Bangert, et al., 2018; de Assis, et al., 2011). Como alternativa, se desarrolló una prueba con tira reactiva que contiene antígenos de membrana de *L. (L.) donovani*, que presenta una sensibilidad y especificidad del

100% en pacientes indios y brasileños con LV (Saha, et al., 2011). Esta prueba se evaluó posteriormente para LV, utilizando sueros de más de 1000 sujetos de ocho centros en seis países endémicos (India, Nepal, Sri Lanka, Brasil, Etiopía y España) (Ejazi, 2019). La sensibilidad y especificidad generales para todas estas regiones fueron del 97,1% y 93,44%, respectivamente, y se encontró un mejor rendimiento de esta prueba en comparación con la prueba rápida rK39, en estas regiones (Ejazi, 2019). Más importante aún, la prueba con tira reactiva no reaccionó de forma cruzada con muestras de suero de pacientes con CL. Previamente se describió una prueba con tira reactiva utilizando este mismo antígeno para la detección de anticuerpos en la orina de pacientes con LV y PKDL (leishmaniasis dérmica post kala-azar) con una sensibilidad del 100% (Ejazi, et al., 2016). Los principales antígenos de membrana reconocidos por el suero de pacientes con LV se caracterizaron por espectrometría de masas e incluyeron el receptor de cinasa C activada (LACK), isoformas de beta-tubulina, cadena α de ATP sintasa, factor de elongación 1- α (EF1- α), GP63, HSP70 y nucleoporinas-93 (NUP-93) (Ejazi, et al., 2020; Ejazi, et al., 2018; Bhowmick & Ali, 2009; Singh, et al., 2019). Más recientemente, la tecnología de impresión directa con láser se utilizó para el desarrollo de un nuevo dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral que contiene las proteínas recombinantes β -tubulina y LiHyp1. Este dispositivo es menos costoso que otras pruebas inmunocromatográficas y presentó alta sensibilidad (90,9%) y especificidad (98,7%) utilizando sangre/suero de pacientes diagnosticados con LV (Humbert, et al., 2019).

En el caso de leishmaniasis cutánea (CL) se evaluó el kit de detección de leishmaniasis Loopamp™ (Loopamp) y la prueba rápida CL Detect™, que

detectan el ADN y el antígeno de *Leishmania*, respectivamente. Se observó que, de 274 sospechosos de CL incluidos en el estudio, la prueba CL Detect mostró una sensibilidad del 65,4% y una especificidad del 100%, mientras que fue del 87,6% y el 70,6% para el kit Loopamp respectivamente (Vink, et al., 2018).

IV. JUSTIFICACIÓN

En el Perú, la leishmaniasis es una de las enfermedades más desatendidas, que afecta sobre todo a la población andina y selvática, la distribución de casos se extiende a 21 regiones del Perú (MINSA, 2022). Considerando que el diagnóstico por lo general depende de las posibilidades tecnológicas existentes en el servicio médico que recibe al paciente, esto no es favorable en las áreas rurales endémicas con recursos limitados.

Entre los principales métodos de diagnóstico, se identificó que el más utilizado fue la microscopía, seguido de las pruebas serológicas (Samir Cubas, et al., 2019). La observación directa (microscopía) como método diagnóstico estándar, especialmente se ha generalizado a lo largo de las zonas rurales endémicas debido a la facilidad de uso y rapidez del diagnóstico (Lamm, et al., 2018); sin embargo, una limitante es que requiere de experiencia técnica para identificar correctamente del parásito (Bailey & Lockwood, 2007), asimismo, la sensibilidad de la prueba es altamente variable; si bien esta prueba ha sido superado con el uso de la PCR para detectar ADN de *Leishmania*, al proporcionar una buena sensibilidad y especificidad (Vega-Lopez, 2003), este método es más costoso y requiere equipos sofisticados, dificultando su implementación en los POC (de Vries, et al., 2015; Gomes, et al., 2014; Salman, et al., 1999; Mitropoulos, et al., 2010).

Las pruebas serológicas se han empleado para el cribado y el diagnóstico definitivo de diversas enfermedades parasitológicas por su facilidad y precisión. Para las leishmaniasis, estos métodos se aplican en gran medida, siendo, en algunos protocolos de rutina, el principio diagnóstico único, antes de la

prescripción de fármacos anti-Leishmania (de Paiva-Cavalcanti, et al., 2015). La mayoría de las técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos anti-Leishmania se han basado en reacciones como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Srivastava, et al., 2013). que tiene la ventaja de que se pueda utilizar para un gran número al mismo tiempo (Ejazi & Ali, 2013). No obstante, la sensibilidad y especificidad de ELISA varían según el antígeno utilizado (Elmahallawy, et al., 2014; Reimão, 2020), que en la mayoría de los casos es una mezcla compleja y heterogénea de antígenos del estadio promastigote de *Leishmania* spp. Para lograr la mejora de las pruebas serológicas, se han introducido antígenos recombinantes (Zijlstra, 2001) o antígenos peptídicos sintéticos (Fargeas, et al., 1996). En este contexto en el laboratorio de Pathoantigenos se tiene patentado dos oligopéptidos sintéticos opH2A y opLiP2a y posteriormente validados bajo el formato de ELISA indirecto para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea, mostrando una mayor sensibilidad (82.04%) y especificidad (98.67%), por análisis combinatorio de ambos péptidos. Por otro lado, las desventajas de esta prueba serológica incluyen alto consumo de tiempo, la necesidad de profesionales especializados, equipos sofisticados, siendo su uso limitado en regiones endémicas (Elmahallawy, et al., 2014; Reimão, 2020).

Este estudio propone el uso de una prueba rápida en formato lateral Flow Assay (LFA) para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea, esta herramienta de diagnóstico ofrece varias ventajas, ya que son fáciles de usar (la prueba se puede realizar después de un entrenamiento mínimo), son rápidas (los resultados están disponibles en 10-30 minutos), y los resultados son fáciles de interpretar (lectura visual); además, emplean pequeños volúmenes de muestra y no requieren equipos

sofisticados, siendo LFA un método confiable que puede ser llevado a cabo fácilmente por personal sin experiencia en condiciones de campo (Fraga, 2016; Garcia, et al., 2020). A pesar de que no se encontró trabajos anteriores en la aplicación del LFA en leishmaniasis tegumentaria americana, esta tecnología ha mostrado buenos resultados en el serodiagnóstico de leishmaniasis visceral, ya sea utilizando antígenos de membrana de *L. (L.) donovani* (Ejazi, 2019) o antígeno quimérico recombinante (k9, k39 y k36) (Anfossi, et al., 2018).

Por lo tanto, la aplicación de una prueba en formato Lateral Flow Assay “LFA” que utiliza oligopéptidos inmunogénicos sensibles y específicos, principalmente en zonas endémicas donde los servicios de los puntos de atención (POC) son precarios o inexistentes, consideramos que sería valioso para brindar un tratamiento oportuno y ayuden a definir una estrategia de control.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Desarrollar y validar en laboratorio tres pruebas rápidas en formato Lateral Flow Assay (LFA) con Antígeno Total Soluble de *Leishmania* “ATSL” y oligopéptidos sintéticos opH2A y opLiP2a, para el serodiagnóstico de Leishmaniasis cutánea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

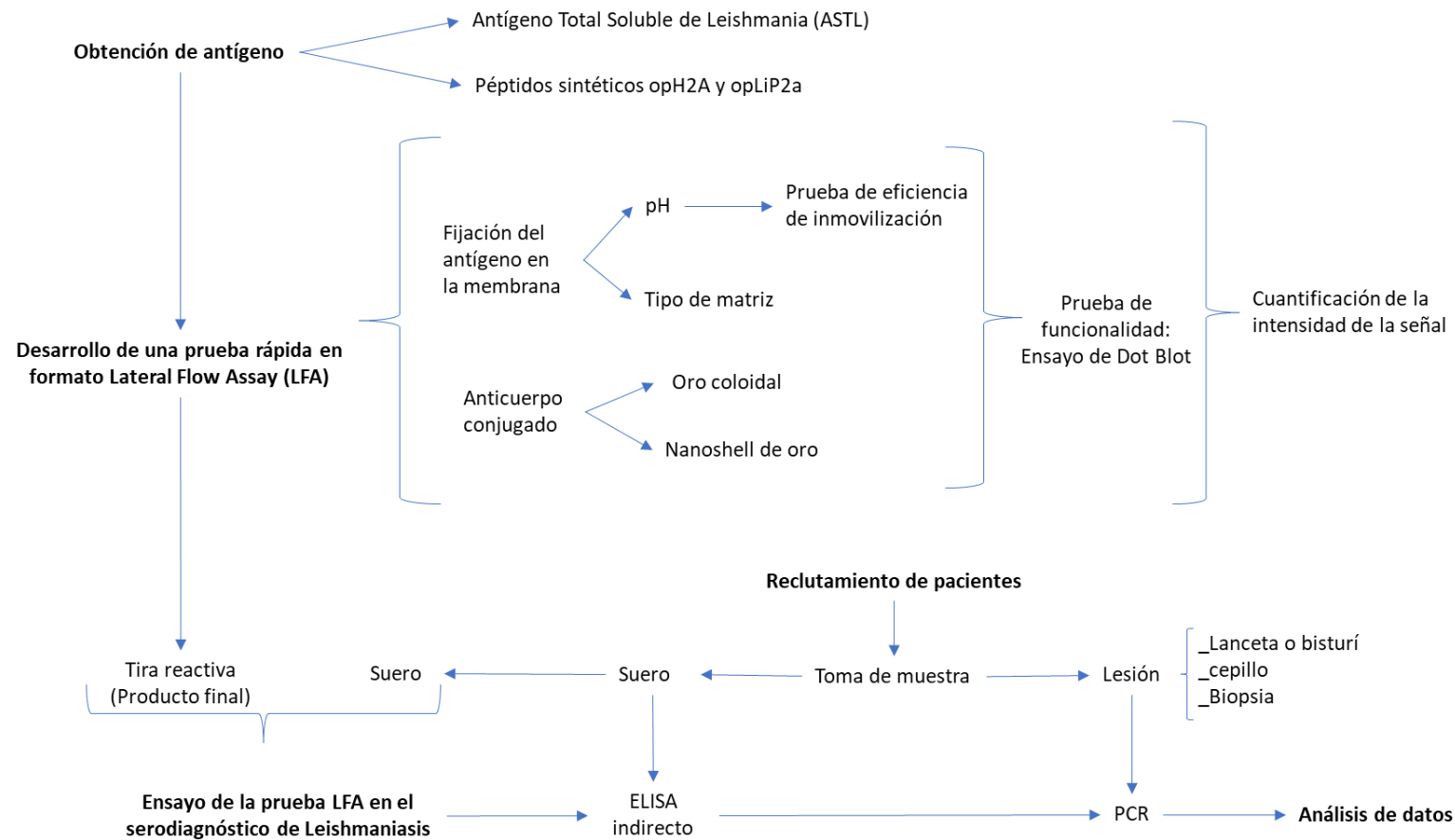
1. Establecer las condiciones de fijación del antígeno en nitrocelulosa y seleccionar el tipo de matriz de la prueba LFA a través del ensayo “Dot Blot”.
2. Establecer las mejores condiciones de dilución del suero (anticuerpo primario) y seleccionar el tipo de conjugado (anticuerpo secundario) de la prueba LFA en opLiP2a.
3. Comparar las muestras de sueros positivos y negativos en la prueba rápida en formato LFA por puntuación visual e intensidad relativa
4. Estimar la sensibilidad y especificidad de la prueba rápida en formato LFA de ATSL, opH2A y opLiP2a.
5. Evaluar el grado de concordancia entre la prueba de LFA y ELISA para cada antígeno.

VI. METODOLOGÍA

6.1. Diseño experimental

En el presente trabajo de investigación tuvo un alcance experimental y transversal en el desarrollo y validación de una prueba rápida en formato Lateral Flow Assay (LFA) para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea.

Flujograma del estudio



6.2. Población y muestras de estudio

Se utilizó un total de 186 muestras de suero en este estudio, recolectadas de Cusco (zona endémica) y Lima (zona no endémica) en un estudio previo y almacenadas a -20°C en el Laboratorio de Patho antígenos, Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), UPCH. Para definir el “n” muestral, se empleó la siguiente formula (Crowther, 2001):

$$n = \frac{(4 \times Dsp \times (1 - Dsp))}{e^2}$$

Donde:

Dsp =Sensibilidad o Especificidad diagnostica que se busca (proporción esperado)

e = error permitido en la estimación de la Sensibilidad o Especificidad diagnostica (precisión permitida)

Para la estimación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica se consideró un nivel de confianza del 95%. Para el diagnóstico de leishmaniasis, se consideró un error porcentual permitido (precisión estadística) del 10.7% para la Sensibilidad diagnostica (SnD) y del 4.7% para la Especificidad diagnostica (EsD), esto debido a la disponibilidad de muestras; entonces para una sensibilidad esperada del 82.04% (estimador estadístico muestral) se ensayaron 50 muestras de suero positivos y tomando en cuenta una especificidad esperada del 93% se ensayaron 114 muestras de suero negativas.

Adicionalmente, se evaluaron 30 sueros de pacientes con diagnóstico de Chagas y 19 pacientes con diagnóstico de Malaria, para verificar posible reactividad cruzada.

6.3. Consideraciones éticas

El presente estudio, fue registrado con código SIDISI 205962 y aprobado por Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la UPCH (CIEI-147-15-24). El trabajo de investigación utilizó sueros de pacientes e individuos sanos de áreas endémicas, recolectados bajo consentimiento informado. Los individuos que fueron invitados a participar de manera voluntaria en el Hospital Nacional Adolfo Guevara Velasco, hospital general de la seguridad social ubicado en Cusco, durante el periodo 2019-2022 como parte del proyecto “Desarrollo de una prueba rápida en formato Lateral Flow Assay (LFA) para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria americana en centros de atención primaria de salud en áreas rurales endémicas del Perú”, (SIDISI 103155), aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (carta de aprobación del CIEI N° 063-05-19 de fecha 30/01/2019). Estas muestras tienen la autorización del paciente para un uso futuro (10 años), en otras investigaciones.

6.4. Toma de muestras

Se tomó un raspado y/o biopsias de la lesión y una muestra de sangre, la cual fue centrifugada para obtener el suero. Se hizo una alícuota del suero en glicerol para su almacenamiento a -20°C a una dilución 1/1 (1 volumen de suero:1 volumen de glicerol). Las muestras de raspado y/o biopsias fueron transportadas desde Cusco hasta Lima, donde se realizó el diagnóstico por PCR convencional y confirmación mediante ADNk la presencia del parásito.

6.5. Diagnóstico mediante la prueba de PCR cualitativa

El diagnóstico fue realizado como parte del servicio brindado a los pacientes y los resultados se utilizaron en el estudio. Como primer paso, el ADN de cada muestra se aisló utilizando el kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con la única excepción de que la incubación para la lisis se realizó durante toda la noche. El ADN obtenido se guardó a -20 °C hasta su uso.

La detección del parásito, fue realizado mediante una PCR que tiene como blanco al ADN minicírculo del kinetoplasto (ADNk) (Lopez, et al., 1993). Brevemente: la reacción con el kit HotStar Taq Plus DNA Polymerase kit (QIAGEN), se realizó en un volumen de 25 µL conteniendo los cebadores MP1-L (TACTCCCCGACATGCCTCTG) y MP3-H (GAACGGGGTTTCTGTATGC) que amplifican un fragmento de 70 pb del ADNk de especies del subgénero *L. (Viannia)* y los cebadores controles HBBL (fwd) 5'-GGCAGACTTCTCCTCAGGAGTC-3' y HBBR (rev) 5'-CTTAGACCTCACCT GTGGAGC-3' que amplifican 197 pb del gen de la beta-globina humana. Las condiciones de PCR empleado son: 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, unión de los primers a 60°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 15 segundos y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa (Cleaver) al 3% y teñidos con bromuro de etidio para su posterior visualización (Boggild, et al., 2007).

6.6. Inmunoensayo enzimático indirecto, ELISA, para la detección de anticuerpos anti-IgG en suero de pacientes humanos.

La prueba de ELISA indirecto se realizó según lo descrito por Valdivia-Francia (2018) para ATSL y se modificó para los péptidos biotinilados. Cada placa de ELISA fue sensibilizada durante la noche con 100 µl por pocillo de estreptavidina a una concentración de 12.5 µg/mL y 2 µg/mL para ATSL. Luego se lavó 6 veces con PBS-Tween 20 al 0.05% (PBST) con lavador automático (ImmunoWash 1575- BioRad) y una vez con PBS pH 7.4, manualmente. Se realizó el bloqueo por 3 horas a 37°C con 300 µl por pocillo de MPBST (PBS-Tween 20 al 0.05% más 3% de skim milk) para ATSL y BPBST (PBS-Tween 20 al 0.05% más 3% de BSA) para estreptavidina. En el caso de la placa fijada con estreptavidina, se realizó un lavado como se describe anteriormente y se incubó a 37°C con 100 µl del péptido biotinilado que tiene una concentración de 50 µg/mL en PBS pH 7.4. Posteriormente tanto para ATSL y estreptavidina-oligopéptido biotinilado, se lavó nuevamente la placa de acuerdo a lo detallado previamente y se colocaron 100µl por pocillo de cada suero por duplicado de pacientes con LC, individuos sanos y los controles de referencia positivo y negativo. Se utilizó una dilución 1/200 de los sueros disueltos en MPBT y se incubó por 1.5 horas a 37°C. Culminado el tiempo de incubación, se lavó la placa de acuerdo a lo indicado anteriormente. Se procedió a agregar 100µl por pocillo del anticuerpo secundario, anti-IgG humano producido en cabra unido a la enzima peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase – HRP, Sigma-Aldrich) y se incubó por 1 hora a 37°C. Se lavó los pocillos nuevamente y finalmente se añadió la solución del sustrato cromogénico tetrametil-benzidina (TMB, SureBlue, KPL) que produce un color azul al

reaccionar con la enzima HRP. La reacción se detuvo después de 10 minutos con ácido sulfúrico (H_2SO_4 2N), que cambiara el color a amarillo. Se leyó la absorbancia (OD450nm) de la reacción empleando el lector de ELISA (iMARK Microplate Reader – BioRad) con longitudes de onda de 450-650 nm.

6.7. Obtención de antígeno total soluble (ATSL) de *L. braziliensis*.

Para preparar antígeno total soluble se empleó una cepa de *L. braziliensis* LC2177. Los promastigotes se cultivaron a 26 °C en medio 199 (M199; Sigma) suplementado con 20% de Suero fetal bovino (FBS) (BioWest), 1% de antibióticos: 100 UI/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y fueron cosechados en fase estacionaria (día 4). Los parásitos se lavaron 3 veces con PBS pH 7.4 a 4°C, y se re-suspendieron a una concentración de 1×10^9 parásitos/mL en buffer de lisis Tris-HCl que contiene inhibidor de proteasas (Roche). Los parásitos se sometieron a 10 ciclos de frío-calor de 1 minuto en hielo seco con etanol y 2 minutos en baño maría a 37°C. Posteriormente fueron sonicados a 60Hz, 4°C por 10 ciclos de 1 minuto cada ciclo (15 segundos sonificado y 45 segundos de reposo). La suspensión de parásitos lisados se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se colectarán las proteínas solubles del sobrenadante, se verificó la integridad y calidad de las proteínas obtenidas mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE y se calculó la concentración de proteína por el kit comercial “Non-Interfering Assay” (Calbiochem, USA) (Valdivia-Francia, 2018).

6.8. Péptido sintético opH2A de *Leishmania*.

Los péptidos biotinilados opH2A y opLiP2a fueron sintetizados por la empresa Bio-synthesis Inc (Texas, EE. UU.). El péptido opH2A tiene una secuencia de 12 aminoácidos y tiene un carácter básico. El péptido opLiP2a tiene una secuencia de 20 aminoácidos y tiene un carácter ácido.

opH2A: (Biotina)-KGGKKGKATPSA

opLiP2a: (Biotina)-AGAGAGAVAEAKKEEPEEEEE

6.9. Optimización de la fijación del antígeno en la matriz de nitrocelulosa.

Se optimizaron las condiciones fijación del oligopéptido opLiP2a en la membrana de nitrocelulosa a través del sistema biotina-estreptavidina, se evaluó principalmente el pH y el tipo de matriz. Para los ensayos de optimización se usaron sueros de un paciente en el que se detectó el ADNk del parásito y de un individuo en el que no se detectó leishmaniasis (control negativo), además de un control sin suero (Blanco). Las imágenes de las tiras se obtuvieron utilizando un scanner o el fotodocumentador Gel Doc XR, (BIO RAD), después se analizó la intensidad del color generado utilizando el software GelAnalyzer 23.1.1 y el programa Image Lab 6.1 (BIO RAD), finalmente se calculó la intensidad relativa de la línea de prueba en referencia a la intensidad de la línea de control (IgG anticabra).

6.9.1. Prueba de eficiencia de inmovilización.

Para evaluar la eficiencia de inmovilización, se utilizó un sistema de desafío de flujo lateral para evaluar qué tan fuerte se inmoviliza una proteína en la membrana

y en qué medida está sujeta a la eliminación por una solución de desafío (PBST) (Holstein, et al., 2016). Para el desafío de flujo lateral, la membrana de nitrocelulosa (GE, Amersham, Protran 0.2 μ m) se cortó en forma de tiras y sobre estos se dispensó manualmente 0.5 μ L de la solución de antígeno, en forma de un punto. Después del secado a 37 °C toda la noche, se sometió a dos lavados en PBST y otros dos con PBS pH 7.4 (sin Tween-20). La cantidad de proteína restante en la membrana se visualizó por tinción de Coomassie, cada membrana se incubó durante 10 minutos con solución de tinción, seguido de 10 minutos con solución decolorante, ambas con agitación. Este protocolo, adaptado de Metkar et al., utiliza una solución decolorante de 50% de H₂O, 40% de metanol y 10% de ácido acético glacial, y una solución de tinción de 0.0025% p/v de azul brillante de Coomassie en solución decolorante (Metkar, et al., 1995).

6.9.2. Prueba de funcionalidad: Ensayo de Dot Blot.

La membrana de nitrocelulosa (GE, Amersham, Protran 0.2 μ m) se preparó como se describió anteriormente (Prueba de eficiencia de inmovilización), después del lavado con PBS, las áreas libres de las tiras se bloquearon con buffer de bloqueo “MPBST” y se incubó a temperatura ambiente durante la noche. Al siguiente día, las tiras se lavaron tres veces con PBST y PBS pH7.4 (sin Tween-20) seguido de secado a 37°C por una hora. Posteriormente, las muestras de suero en buffer glicerolado (1:1) a una dilución 1: 100 en buffer de bloqueo se incubaron con las tiras durante 15 min a 37°C. Después de dos lavados en PBST y PBS pH 7,4, las tiras se incubaron con anti-IgG humana de cabra conjugada con peroxidasa diluida 1: 2000 durante 15 min a 37°C. Después, dos lavados en PBST y un lavado final en PBS pH 7,4, las tiras se incubaron durante 3 min en una solución de sustrato

recién preparada que tiene 0,05% de tetrahidrocloruro de 3, 3'-diaminobencidina (DAB, Sigma, EE.UU.) que contiene 0,05% de H₂O₂ en agua estéril. La reacción se detuvo sumergiendo las tiras en agua destilada durante 2 min. La mancha de color negro representa la reactividad anti-leishmania de las muestras de suero (Ejazi, et al., 2016).

6.10. Preparación de las tiras reactivas de diagnóstico – Prueba LFA

Las líneas de prueba y control se distribuyeron en una tarjeta de membrana Millipore Hi-Flow Plus con respaldo previo (60 x 300 mm) usando un dispensador ZX 1000 (BIODOT). La línea de prueba de estreptavidina-péptido se preparó de acuerdo a las condiciones óptimas de fijación y fueron dispensados a 0.1 µL/mm, a distancia desde la parte superior de la tarjeta de 35 mm. La línea de control consistió en una solución de anti-cabra de burro (Arista Biologicals Inc.) en 0.2 mg/mL en PBS pH 7.4, dispensado a una velocidad de 0.04 µL/mm, a 25 mm desde la parte superior de la tarjeta. Las tarjetas se secaron a 37 °C toda la noche, se realizó un lavado con PBST, se incubaron en buffer de bloqueo por 6 horas a temperatura ambiente, terminado el tiempo se hizo dos lavados en PBST y un lavado final en PBS pH 7,4 y se secaron a 37 °C por 72 horas y finalmente se almacenaron en una caja sellada herméticamente con desecante de gel de sílice, hasta su uso. Los revestimientos de liberación se retiraron de la tarjeta de respaldo para revelar las partes adhesivas. Se añadió una almohadilla absorbente en un extremo de la tarjeta, superponiendo 2 mm con la membrana de nitrocelulosa. En el extremo opuesto, se colocó una almohadilla de fibra de vidrio para solapar 2 mm con la membrana de nitrocelulosa, el ensamble se realizó en el Laminador Clamshell, LM 5000 (BIODOT). Las tarjetas ensambladas se cortaron en tiras de

4 mm de ancho y se almacenaron en bolsas de aluminio en un contenedor hermético con gel de sílice.

6.10.1. Procedimiento de la prueba rápida en formato LFA

Se mezcló 2 μL de suero en 100 μL de PBS pH7.4 en un tubo de microcentrífuga de 0.6 mL. La mezcla se dispensó directamente sobre el sample pad, en la posición 1 de la Figura N° 3 y se dejó incubando por 10 minutos. Luego, se añadió lentamente 100 μL de PBS pH7.4 en el conjugate pad, en la posición 2 de la figura 3 y se dio un tiempo de 15 minutos. Pasado el tiempo se agregó 25 μL del anticuerpo conjugado con Nanoshell de oro u oro coloidal, este último fue de 50 μL (25 μL de conjugado + 25 μL de PBS pH 7.4) y se dejó por 5 minutos. Finalmente se colocó 100 μL de PBS en el conjugate pad y después de 10 minutos, se procedió a realizar la lectura.

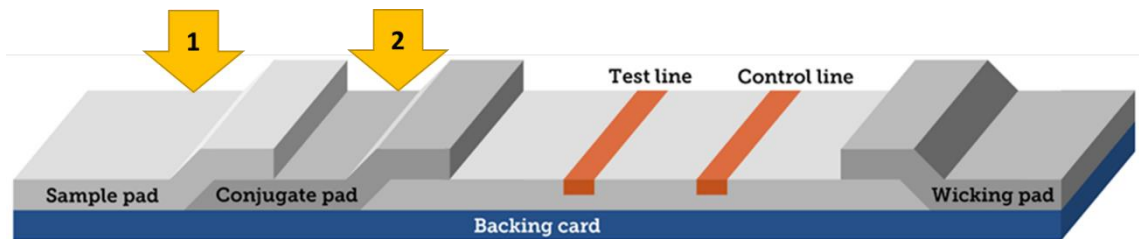


Figura N° 3: Tira de ensayo que muestra las posiciones de la línea de prueba y de control, así como dónde se deposita la muestra de suero (1), el anticuerpo conjugado y PBS (2).

6.10.2. Selección de las mejores condiciones de dilución del suero y del tipo de conjugado (oro coloidal y Nanoshell de oro) de la prueba LFA que utiliza opLiP2a

Con el fin de establecer la mejor condición de detección de la prueba, los sueros control negativo y positivo fueron evaluados mediante un ensayo dosis-

dependiente. El suero positivo fue diluido en el suero negativo seleccionado. Se realizaron 7 diluciones (que incluyeron el rango entre 1 y 1/128). Cada una de las diluciones fue diluida 1/100 en PBS pH 7.4 y fueron aplicados en la prueba LFA, de acuerdo a lo descrito en 6.8.1. La detección se realizó con oro coloidal y Nanoshell de oro.

6.11. Plan de análisis del serodiagnóstico de leishmaniasis

6.11.1. Puntuación visual

La intensidad de las líneas de la prueba LFA se calificaron por comparación con una tarjeta de puntuación visual. Las puntuaciones oscilaron entre 0 (sin señal) y 14 (señal saturada)

Se utilizó una tarjeta impresa con las líneas de prueba, como referencia para cuantificar de forma rápida y económica la intensidad de cada línea de prueba.

6.11.2. Intensidad Relativa – Porcentaje de positividad (PP)

Las imágenes de las pruebas LFA tomados en el fotodocumentador Gel Doc XR, (BIO RAD). se procesaron digitalmente a través del programa Image Lab 6.1 (BIO RAD). Se midió la intensidad de la línea control y de la prueba y se obtuvo la intensidad relativa (Prueba/Control). Los resultados de cada muestra de suero frente a la intensidad relativa del control positivo, fueron presentados en términos de porcentaje de positividad (PP).

6.11.3. Análisis de datos

El LFA desarrollado se validó usando suero de pacientes con leishmaniasis detectado por PCR convencional y sueros de individuos sanos de áreas de

endemicidad y de áreas donde la enfermedad no es endémica. Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico STATA17, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk, para evaluar la normalidad de los datos. Para la comparación entre variables se empleó el test no paramétrico U de Mann-Whitney en las evaluaciones entre pares de los grupos evaluados, y se realizó una prueba de comparación de proporciones. Se midió la concordancia utilizando el coeficiente de correlación intraclase, a nivel de puntuación visual e intensidad relativa, dos medidas obtenidas de la prueba observador LFA. El nivel de significancia estadística fue establecido en $p < 0.05$.

Finalmente, las muestras se clasificaron como verdadero positivo (VP), verdadero negativo (VN), falso positivo (FP) o falso negativo (FN), para estimar la sensibilidad y la especificidad diagnóstica de la prueba. Se calcularon de la siguiente manera:

$$Sensibilidad (\%) = \frac{VP}{(VP + FN)} \times 100$$

$$Especificidad (\%) = \frac{VN}{(VN + FP)} \times 100$$

Se estimaron los valores de Kappa para encontrar el grado de concordancia de la prueba de ELISA y LFA.

VII. RESULTADOS

7.1. Establecimiento de las condiciones óptimas de fijación del Antígeno Total

Soluble de Leishmania “ATSL” en la matriz de nitrocelulosa.

El antígeno total soluble de *L. braziliensis* LC2177, se obtuvo a partir de un cultivo de 30 mL de promastigotes en fase estacionaria (cuarto día de crecimiento), se recuperó 3 mL de antígeno total soluble de *L. braziliensis* LC2177 con una concentración de 0.96 mg/mL. El antígeno (ATSL) obtenido fue dividido en alícuotas de 100 µl y fue almacenado a -70 °C hasta su uso.

- **Eficiencia de inmovilización**

En primer lugar, se evaluó la fijación de IgG anti-cabra (línea control) a una concentración de 200 µg/mL, se midió la intensidad de los puntos dispensados en la tira sin lavado (sin PBST) y con lavado (PBST), luego las intensidades se normalizaron (PBST/ sin PBST), se observó que la capacidad de inmovilizarse en la nitrocelulosa es de un 60 % después de los lavados. En el caso de ATSL (línea de prueba), las diferentes concentraciones de menor a mayor se relacionaron directamente con la intensidad de coloración por Coomassie, ver figura N° 4, siendo el ATSL detectado mínimamente a 200 µg/mL y con una máxima intensidad a 967 µg/mL, este último refleja una alta inmovilización de proteínas en la nitrocelulosa, después de la etapa de lavado.

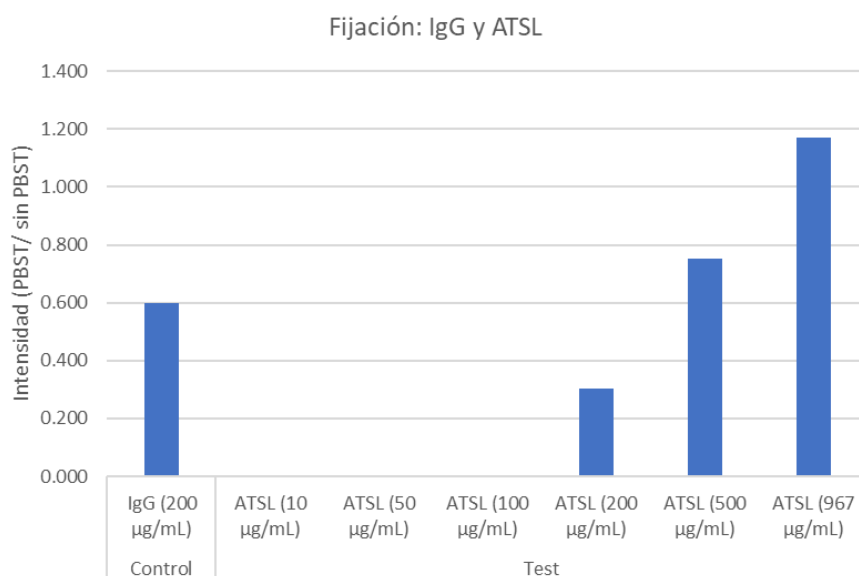


Figura N° 4: Eficiencia de inmovilización de IgG y ATSL en nitrocelulosa

- **Funcionalidad por Dot Blot**

La disponibilidad de un panel de sueros que previamente fueron caracterizados por ELISA con el mismo antígeno (ATSL), permitió la selección de dos sueros como control negativo y control positivo. Se considero las siguientes condiciones de fijación, ATSL de 10 µg/mL a 967 µg/mL en PBS pH 7.4, secado a 37 °C por 12 horas. En estos primeros resultados se observó una señal alta de la línea de control (IgG anticabra) visiblemente mayor a ATSL, cuando fueron medidos ya sea con el programa GelAnalyzer 23.1.1 o Image Lab 6.1 (BIO RAD), los valores de intensidad de la línea de control de las tiras, presentaron en general un coeficiente de variación menor al 15%. En el análisis de ATSL, se encontró una relación directa entre la concentración del antígeno y la señal emitida por el DAB, con un límite de detección de 50 µg/mL que tiene una intensidad del 20% con respecto a la linea control, así mismo la formación del inmunocomplejo es de

manera específica al reconocer los antígenos fijados en la membrana de nitrocelulosa (GE, Amersham, Protran 0.2 μm).

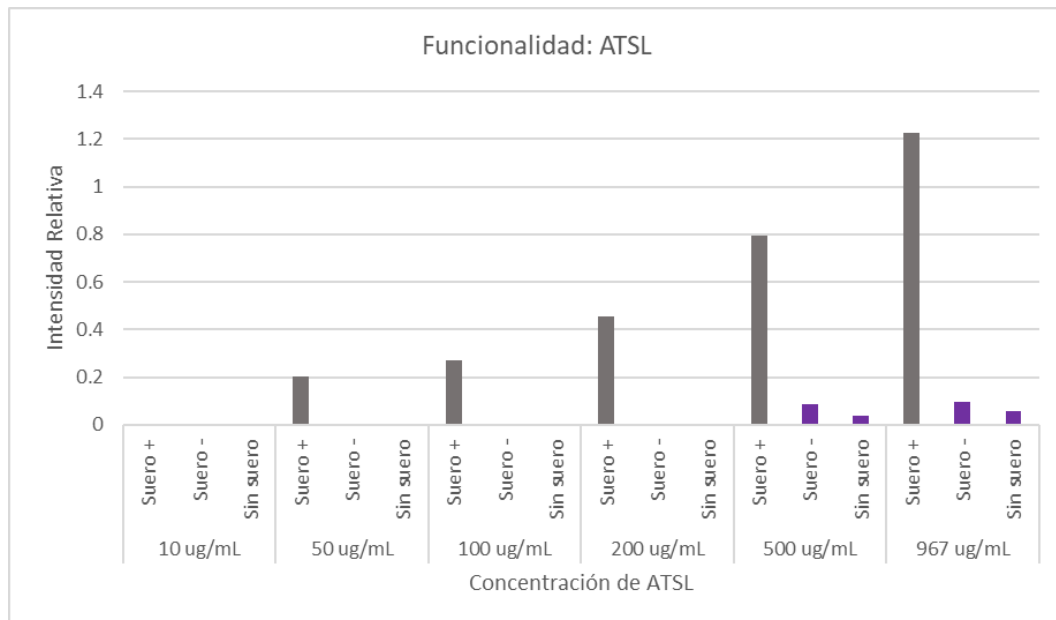


Figura N° 5: Ensayo de Dot Blot de ATSL

7.1.1. Selección del tipo de matriz de fijación del Antígeno Total Soluble de *Leishmania* “ATSL”

Los primeros ensayos se realizaron en la membrana de nitrocelulosa (GE, Amersham, Protran 0.2 μm), la etapa de selección del tipo de matriz se realizó en las membranas disponibles de Whatman/GE, en sus tres presentaciones FF080HP, FF120HP y FF170HP.

- **Eficiencia de inmovilización**

Las intensidades medidas del control IgG anti-cabra (200 $\mu\text{g/mL}$) y de ATSL (200 y 500 $\mu\text{g/mL}$), se normalizaron (membrana con PBST/sin PBST) y se presentan en la figura N°6. El control IgG se mantuvo fijado aproximadamente en un 50% en las matrices de nitrocelulosa, excepto en FF080HP, que fue un valor menor. La

retención del antígeno total a 500 $\mu\text{g/mL}$ fue doblemente mayor (236%) frente a la etapa sin lavado, en la matriz FF120HP, para 200 $\mu\text{g/mL}$ tubo una eficiencia de fijación de 135% en FF170HP.

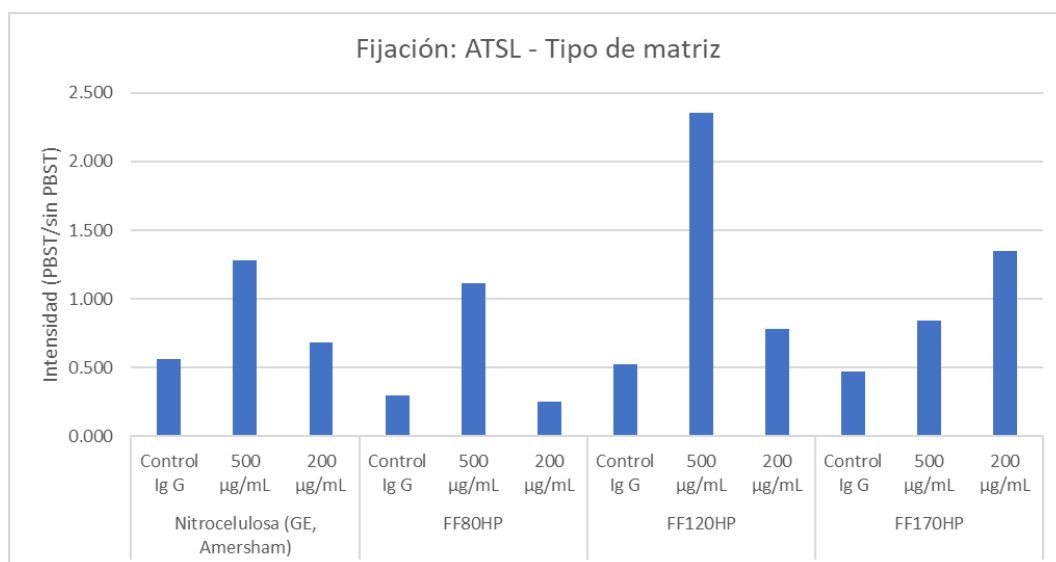


Figura N°6: Prueba de eficiencia de inmovilización de ATSL en diferentes tipos de matriz de nitrocelulosa.

- **Funcionalidad por Dot Blot**

La detección por HRP – DAB y oro coloidal, evaluados en ATSL (200 y 500 $\mu\text{g/mL}$), la reacción del antígeno con anticuerpos antileishmania (suero positivo), presentó una señal que fue medida y normalizada con el control IgG anti-cabra. El antígeno total fijado a una concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$ presentó mayor intensidad en HRP (75%) y oro coloidal (40%), en la matriz FF120 HP, cuando la concentración es 200 $\mu\text{g/mL}$ la intensidad de señal emitida en HRP fue similar en las membranas evaluadas, excepto la nitrocelulosa (GE, Amersham, Protran 0.2 μm). La detección con oro coloidal tuvo un valor ligeramente mayor de 15.4% en la matriz FF080HP. En casi todos los ensayos, el suero control negativo y el

blanco (sin suero) no pasaban el 2% de la intensidad, excepto la concentración de 500 µg/mL en la matriz FF120HP que cuando se realizó la detección por HRP – DAB, presentó un 3 % en el suero negativo.

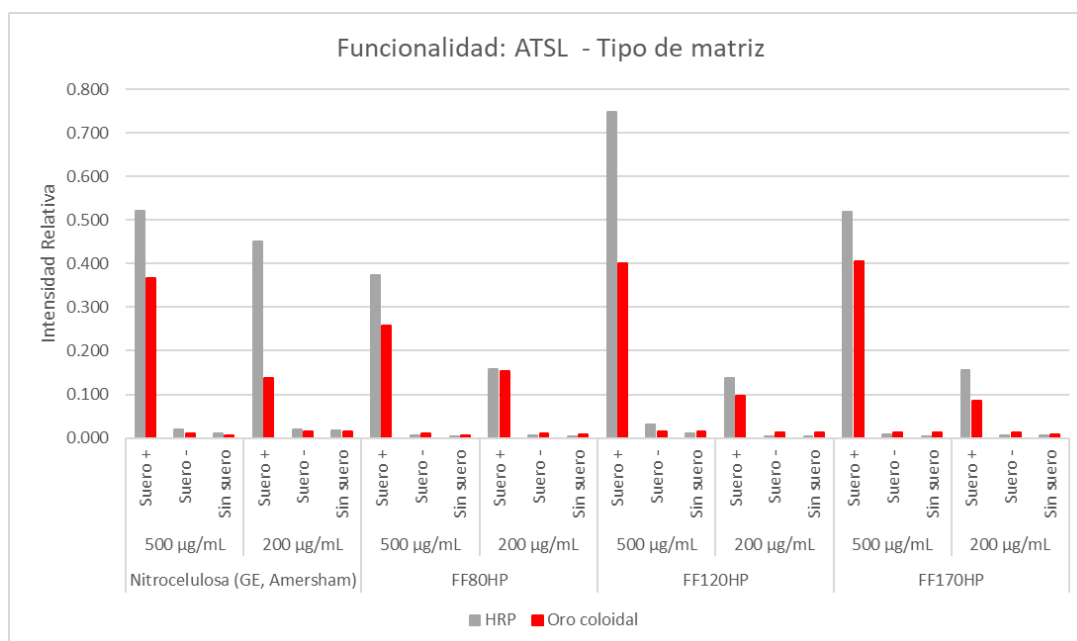


Figura N° 7: Ensayo de Dot Blot de ATSL, en diferentes tipos de matriz.

7.2. Establecimiento de las condiciones óptimas de fijación del péptido antigénico opLiP2a, en la matriz de nitrocelulosa.

Previamente se observó que los péptidos presentaban una mínima o nula fijación en la membrana de nitrocelulosa. Se optó como estrategia de inmovilización, la interacción estreptavidina-biotina, por lo que el péptido se biotiniló en el extremo N-terminal por la empresa Bio-syntesis Inc (Texas, EE. UU.). Se consideró las siguientes condiciones, en las que se evaluó la eficiencia de inmovilización y la funcionalidad del sistema estreptavidina- opLiP2a biotinilado.

7.2.1. Buffer de fijación de Estreptavidina -opLiP2a

- **Eficiencia de inmovilización:**

Se midió la intensidad de los puntos de estreptavidina-opLiP2a en la membrana de nitrocelulosa, así mismo cuando las membranas son sometidas a lavado con PBS-Tween 20 al 0.05% (PBST), de los valores obtenidos se estableció el ratio PBST/sin PBST, ver figura N°8. En el rango de pH probado, se tiene una mayor retención aparente de estreptavidina- opLiP2a (200 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$) en la membrana de nitrocelulosa cuando se utiliza el buffer Acetato pH 5.0 con una retención de proteína de 0.611 ± 0.042 , sin embargo, analizando los datos con la prueba Tukey, esta condición no presentó diferencia estadística con los otros tratamientos, excepto con el buffer Citrato-Fosfato pH 4.6, que presento una diferencia estadística ($p < 0.1$); este último se confirma, cuando se varia la concentración de estreptavidina (500 $\mu\text{g/mL}$), donde se observa una diferencia significativa entre el buffer Acetato pH 5.0 (0.877 ± 0.067) y el buffer Citrato-Fosfato pH 4.6 ($p < 0.1$) y además presenta una diferencia con Bicarbonato-carbonato pH 9.6 ($p < 0.01$) (Anexo).

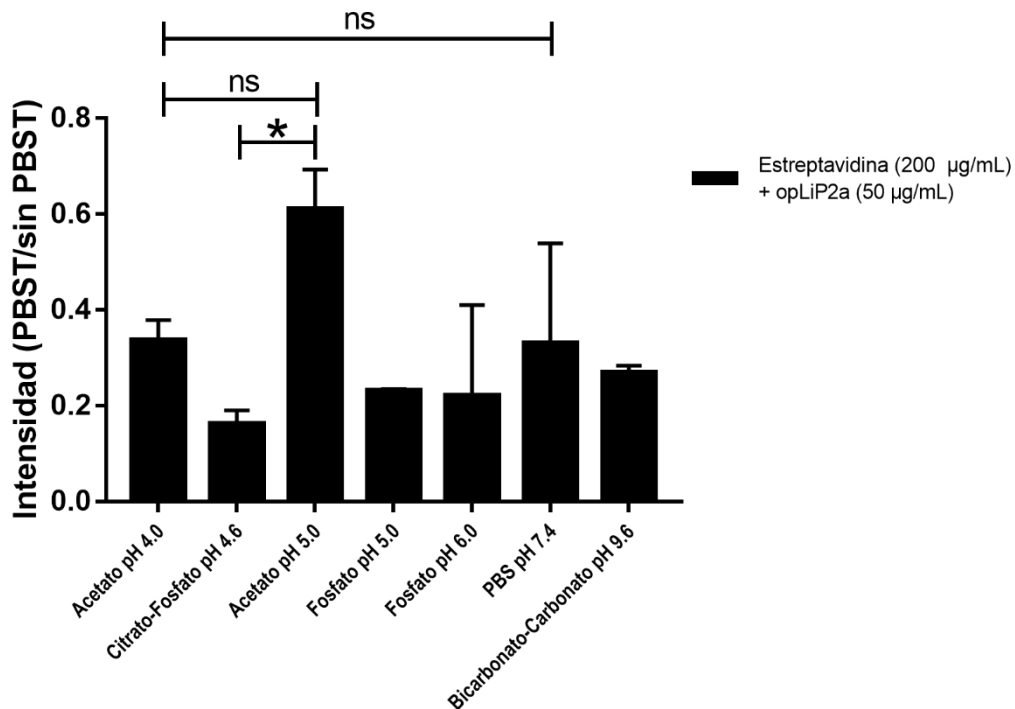


Figura N°8: Prueba de eficiencia de inmovilización de opLiP2a-estreptavidina (200 µg/mL) a diferentes condiciones de pH.

- **Funcionalidad por Dot Blot:**

Se obtuvo la intensidad relativa de la señal de estreptavidina-opLiP2a (forma el inmunocomplejo con el anticuerpo anti-leishmania + anti-humano) en relación al IgG control (reconoce directamente el anticuerpo secundario anti-humano), ambos fijados en una misma tira de membrana, ver figura N°9. La variación del pH en la fijación de estreptavidina- opLiP2a- (200 µg/mL y 50 µg/mL) en la membrana de nitrocelulosa, presento mayores valores de intensidad relativa en el buffer Acetato pH4.0 (0.121 ± 0.029) y pH5.0 (0.146 ± 0.020), de acuerdo a la prueba Tukey, estos presentan una diferencia estadística significativa ($p < 0.001$) con los otros pH probados, sin embargo, cuando se comparan entre sí, los pH del buffer Acetato, no se observa una diferencia significativa. En un ensayo posterior donde se varia la concentración de estreptavidina (500 µg/mL) y se mantiene las demás

condiciones, refleja una diferencia estadística ($p < 0.001$) entre el buffer Acetato pH4.0 (0.104 ± 0.028) y pH5.0 (0.285 ± 0.010) (Anexo).

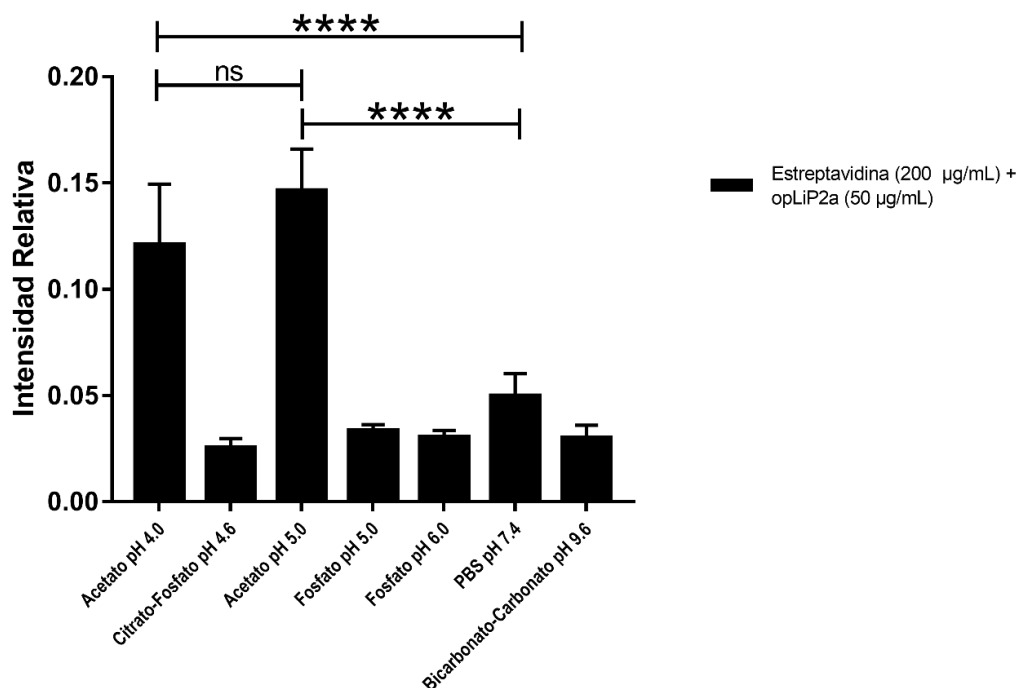


Figura N9: Ensayo de Dot Blot del sistema opLiP2a-estreptavidina (200 µg/mL) a diferentes condiciones de pH.

7.2.2. Selección del tipo de matriz de fijación del péptido opLiP2a

En los resultados de buffer de fijación (7.2.0) descrito anteriormente se utilizó la membrana de nitrocelulosa disponible para ensayos de Western Blot (GE, Amersham, Protran 0.2 µm). Con el fin de obtener la tira diagnóstica en formato LFA, para esta etapa, se consideró las matrices de nitrocelulosa (FF080HP, FF120HP y FF170HP) utilizadas en la producción de pruebas rápidas, estas matrices varían en porosidad y grado de adsorción de la muestra.

Se considero como condición óptima la fijación de estreptavidina – opLiP2a (200 µg/mL y 50 µg/mL) en buffer Acetato pH 5.0 y se dispense como la línea de prueba junto a la línea control (IgG) en la matriz de nitrocelulosa de manera automatizada a través del equipo Biodot y se siguió el protocolo de Dot blot para detectar la señal de reacción en los sueros control positivo y negativo y un blanco (sin suero); para cada tira, se obtuvo la intensidad relativa (señal de la línea de prueba en relación al control) ver figura N°10. Se obtuvo una mayor intensidad relativa en el control positivo de la matriz FF120HP con un valor de 0.132 ± 0.027 y según la prueba Tukey, cuando se compara la matriz FF120HP con FF170HP ($p < 0.05$) y FF080HP ($p < 0.1$) en ambos existe una diferencia estadística, cuando se hace la misma comparación en control negativo y blanco, estos no presentan diferencia significativa.

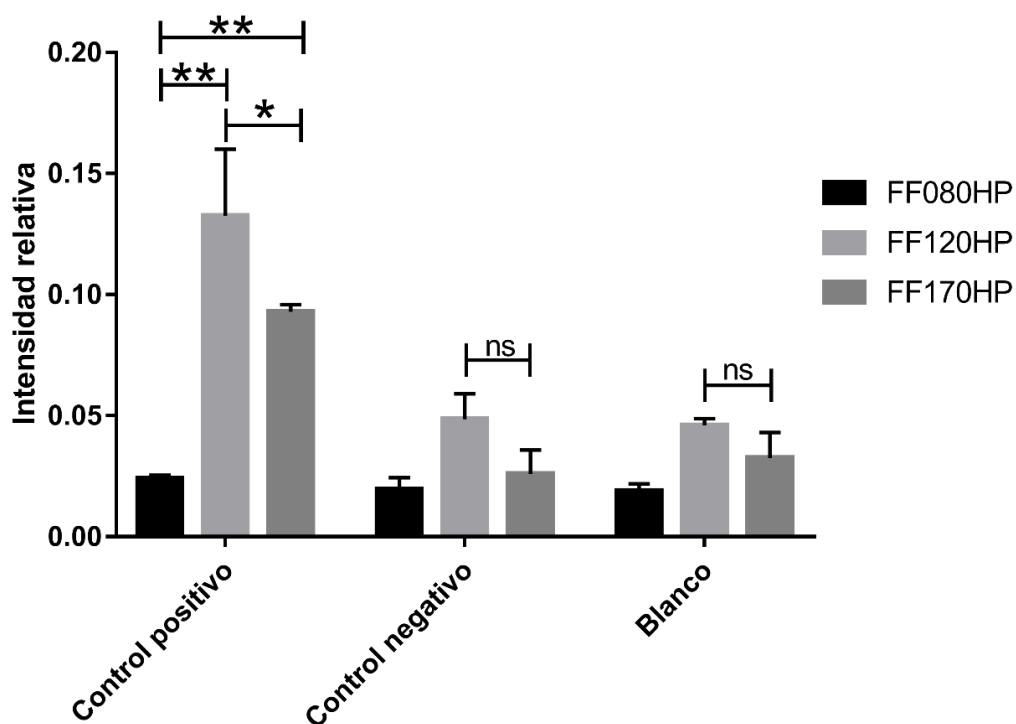


Figura N°10: Ensayo de Dot Blot de opLiP2a, en diferentes tipos de matriz.

7.3. Selección del conjugado y límite de detección

Se hicieron diluciones seriadas de 1/1 a 1/128 del control suero positivo en el control suero negativo, estos a su vez fueron diluidas 1/50 en PBS pH 7.4 y se aplicó a la tira diagnostica en formato LFA que tiene el antígeno opH2A (se siguió los pasos del punto 6.9.1 descrito en la metodología), el sistema de detección se realizó con nanopartículas de oro coloidal y nanoshell de oro. En el gráfico de barras de dilución realizado para los dos conjugados (Figura N°11), se observa que el nanoshell de oro tiene una intensidad relativa mayor a dos veces (0.399 ± 0.008 , punto 0 del gráfico) frente al oro coloidal con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$, Tukey), por otro lado la línea de prueba puede llegar a ser detectado en el nanoshell de oro hasta la dilución 1/8 (punto 3), obteniendo un valor de intensidad relativa de 0.071 ± 0.010 que presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.1$) con el control negativo (C-); en el caso del oro coloidal la detección llega hasta la primera dilución (0.137 ± 0.051 , punto 1), con una diferencia significativa ($p < 0.05$) frente a su control negativo. El límite de detección la prueba LFA que usa nanoshell de oro fue cercano a la prueba de ELISA, que presento una diferencia significativa ($p < 0.1$) en la dilución 1/16 (punto 4) con respecto al control negativo (Anexo).

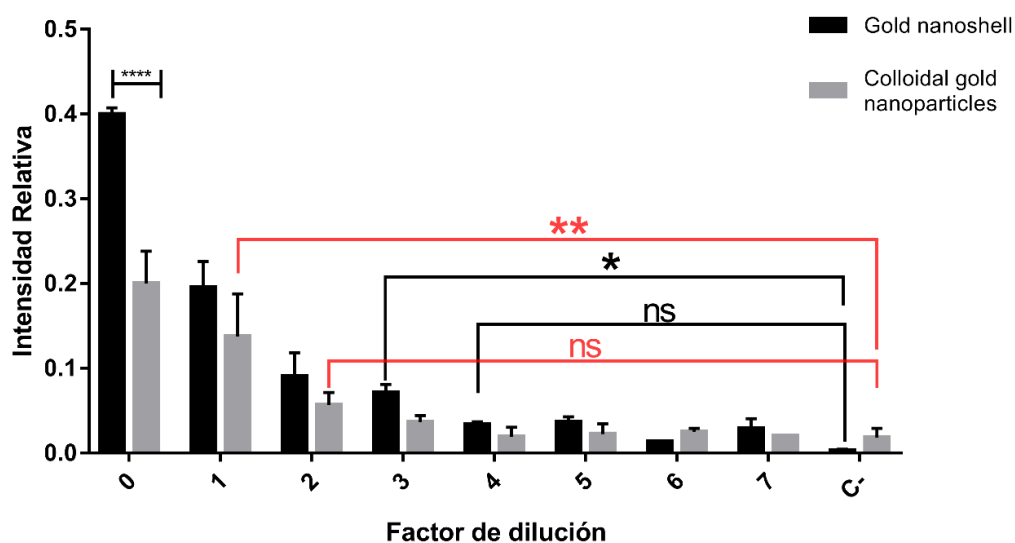


Figura N°11. Selección del conjugado para maximizar la sensibilidad de la prueba. Diluciones seriadas de 1/1 a 1/128 del control positivo en el control negativo diluido adicionalmente 1/100 en PBS. La intensidad del color generado después de la reacción de LFA se capturó usando el software Image Lab (BIO-RAD), la intensidad relativa de la línea de prueba se calculó con referencia a la intensidad del control.

7.4. Comparación de las muestras de sueros positivos y negativos en la prueba rápida en formato LFA por puntuación visual e intensidad relativa.

7.4.1. Correlación entre la puntuación visual e intensidad relativa de la prueba LFA que utiliza ATSL

Se analizaron un total de 164 muestras de sueros en la prueba rápida en formato LFA que utiliza antígeno total (ATSL), donde se tiene 50 muestras positivas (pacientes con leishmaniasis cutánea) y 114 muestras negativas (individuos sanos) de acuerdo a los criterios de inclusión establecidos y descritos en la metodología. Para esta prueba de diagnóstico se utilizó nanopartículas de oro coloidal como

detección de la línea de control y prueba, el resultado de la prueba se calificó en puntuaciones y posteriormente se procesaron digitalmente para obtener la intensidad relativa (línea de prueba/línea de control) (Figura N°12). En el análisis de las muestras positivas, se observó en la puntuación visual, un valor mínimo de 0 y máximo de 10 con una media de 2.67 (SD = 2.645) y para la intensidad relativa el mínimo fue de 0.014 y el máximo de 0.812 con una media de 0.252 (SD = 0.250), de acuerdo a la prueba de Spearman se obtuvo una correlación positiva fuerte ($p < 0.05$; $\rho = 0.86$) entre las dos medidas de intensidad. En el caso de las muestras negativas, para la puntuación visual presento un valor mínimo de 0 y máximo de 8 con una media de 0.521 (SD= 0.8968) y la intensidad relativa un valor mínimo de 0.011 y máximo de 0.826 con una media de 0.069 (SD= 0.1039), ambos resultados mostraron una correlación positiva moderada ($p < 0.05$; $\rho = 0.497$).

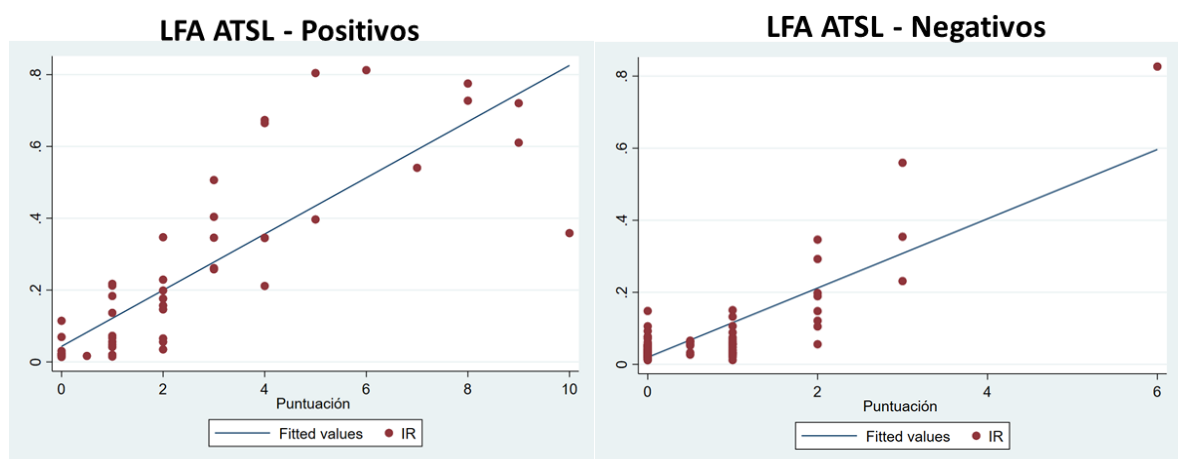


Figura N°12: Nivel de correlación entre la puntuación visual y la intensidad relativa de la prueba LFA ATSL para las muestras positivas (n=50) y negativas (n=114).

7.4.2. Correlación entre la puntuación visual e intensidad relativa de la prueba LFA que utiliza opH2A.

La prueba LFA que tiene el antígeno opH2A, la detección del inmunocomplejo se realizó con el anticuerpo conjugado con Nanoshell de oro, cada prueba se evaluó por puntuación visual e intensidad relativa, los datos obtenidos se compararon para observar si existe una relación entre estos dos tipos de medidas (Figura N°13). En el análisis de las 50 muestras positivas en cuanto a la puntuación visual se tiene una media de 3.08 (SD=3.92) con un valor mínimo=0 y máximo =14, en el caso de la intensidad relativa la media fue de 0.123 (SD=0.225) con un mínimo=0.004 y máximo =1.14, estas dos medidas presentaron una correlación positiva fuerte ($\rho = 0.75$), con un nivel de confianza mayor al 95% ($p < 0.05$, prueba de Spearman). Para las 114 muestras negativas, cuando es medido por puntuación visual tiene una media de 0.588, SD=1.45 (mínimo=0, máximo =9) y por intensidad relativa una media de 0.024, SD=0.054 (mínimo=0.001, máximo =0.459) y de acuerdo a la prueba de Spearman, se observa una correlación positiva débil ($\rho = 0.21$ $p < 0.05$).

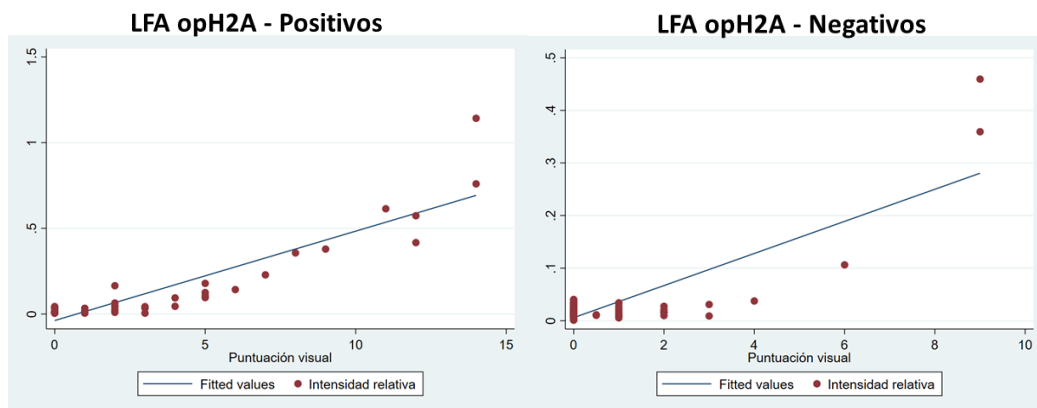


Figura N°13: Nivel de correlación entre la puntuación visual y la intensidad relativa de la prueba LFA opH2A para las muestras positivas (n=50) y negativas (n=114).

7.4.3. Correlación entre la puntuación visual e intensidad relativa de la prueba LFA que utiliza opLiP2a.

Un total de 164 muestras serológicas (positivos =50 y negativos =114) se analizaron por la prueba en formato LFA – opLiP2a y la detección se realizó con Nanoshell de oro, se tomaron los datos de puntuación visual y se compararon con los datos de intensidad relativa (Figura N°14). Las muestras positivas tuvieron una correlación positiva fuerte ($\rho = 0.829$; prueba de Spearman, $p < 0.05$) entre la puntuación visual (media=2.96, SD=1.79; mínimo=0 y máximo =6) y la intensidad relativa (media =0.170 SD=0.148; mínimo=0.014, máximo =0.661). Para las muestras negativas presentaron una correlación positiva débil ($\rho = 0.40$; prueba de Spearman, $p < 0.05$) entre la puntuación visual (media=0.667, SD=1.044; mínimo=0 y máximo =7) y la intensidad relativa (media=0.048, SD=0.65; mínimo=0.014 y máximo =0.685).

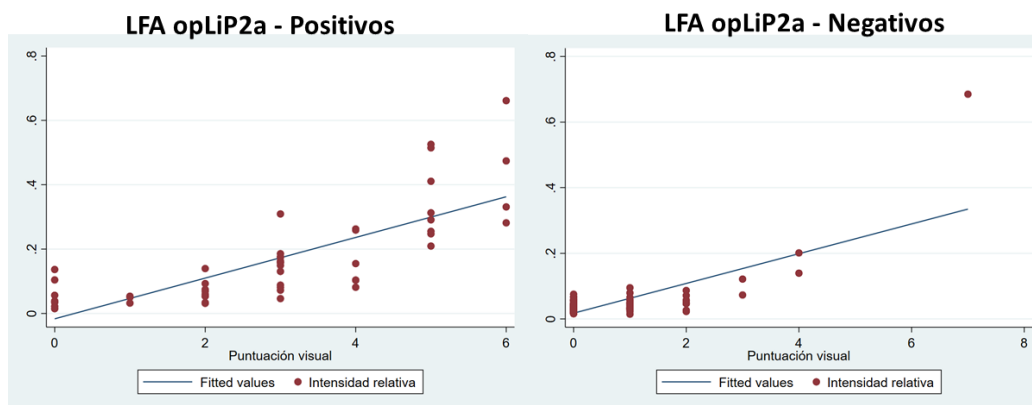


Figura N°14: Nivel de correlación entre la puntuación visual y la intensidad relativa de la prueba LFA opLiP2a para las muestras positivas (n=50) y negativas (n=114).

7.5. Estimación de la sensibilidad y especificidad de la prueba rápida en formato LFA

7.5.1. Determinación del punto de corte y área bajo la curva de la puntuación visual de la prueba LFA

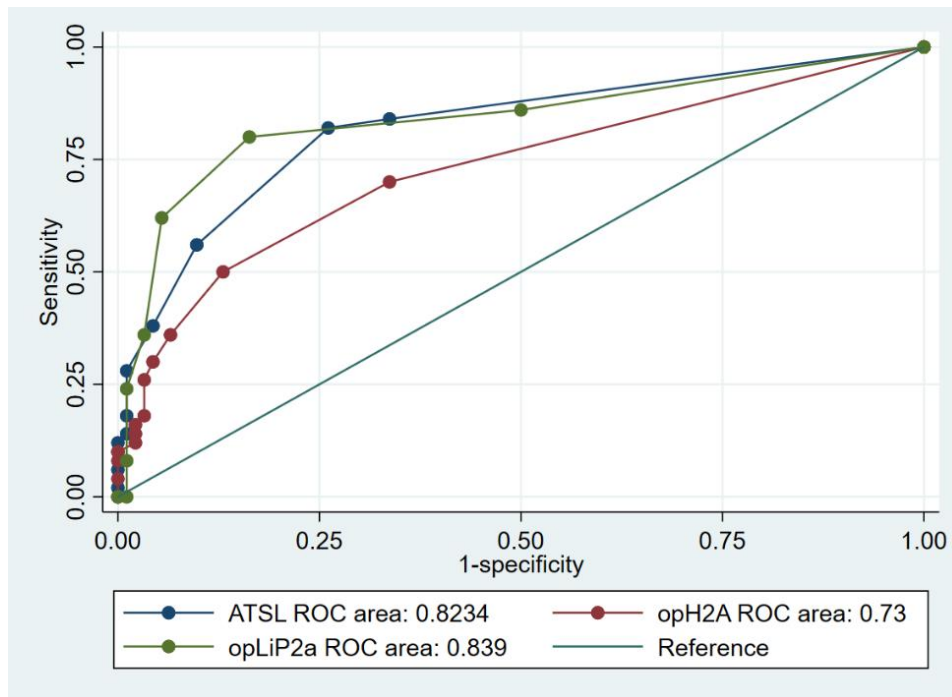
Se realizó una curva ROC (Receiver Operating Characteristic) para cada uno de los antígenos (opH2A, opLiP2A y ATSL), con 50 muestras de suero de pacientes con leishmaniasis cutánea y 92 muestras de suero de individuos sanos de área endémica (Figura N°15) y adicionalmente, otra curva ROC para los mismos antígenos, utilizando el mismo panel de muestras de leishmaniasis cutánea (n=50) y 22 muestras de suero de individuos sanos de áreas no endémicas (Figura N°16).

De la curva ROC se analizó el área bajo la curva (AUC), este permite ver la capacidad discriminatoria de la prueba en los antígenos evaluados. En el análisis de individuos sanos de área endémica en referencia al AUC se observó una buena capacidad discriminativa en el diagnóstico de leishmaniasis en las pruebas de

opLiP2a (0.8390; IC 95% 0.763 – 0.915) y ASTSL (0.8234; IC 95% 0.644 – 0.815), para opH2A se tuvo un AUC de 0.7300 (IC 95% 0.644 – 0.815) siendo aceptable la capacidad discriminativa; de acuerdo a la prueba de Chi cuadrado, tanto los antígenos de opLiP2a y opH2A no presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p>0.05$) con respecto a ATSL. Por otro lado, el panel de sueros que incluye individuos sanos de áreas no endémicas, se tiene una excelente capacidad discriminativa en el diagnóstico de leishmaniasis cuando se utiliza como antígeno el opLiP2a con una AUC de 0.9118 (IC 95% 0.852 – 0.971) y de acuerdo a la prueba de chi cuadrado opLiP2a presenta una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) con el valor de AUC de ATSL (0.7541; IC 95% 0.650 – 0.859), este último cuando se compara con el AUC de opH2A (0.8250; IC 95% 0.748 – 0.902), no se observa una diferencia significativa ($p>0.05$), sin embargo tiene una buena capacidad de distinguir entre pacientes con leishmaniasis e individuos sanos de áreas no endémicas.

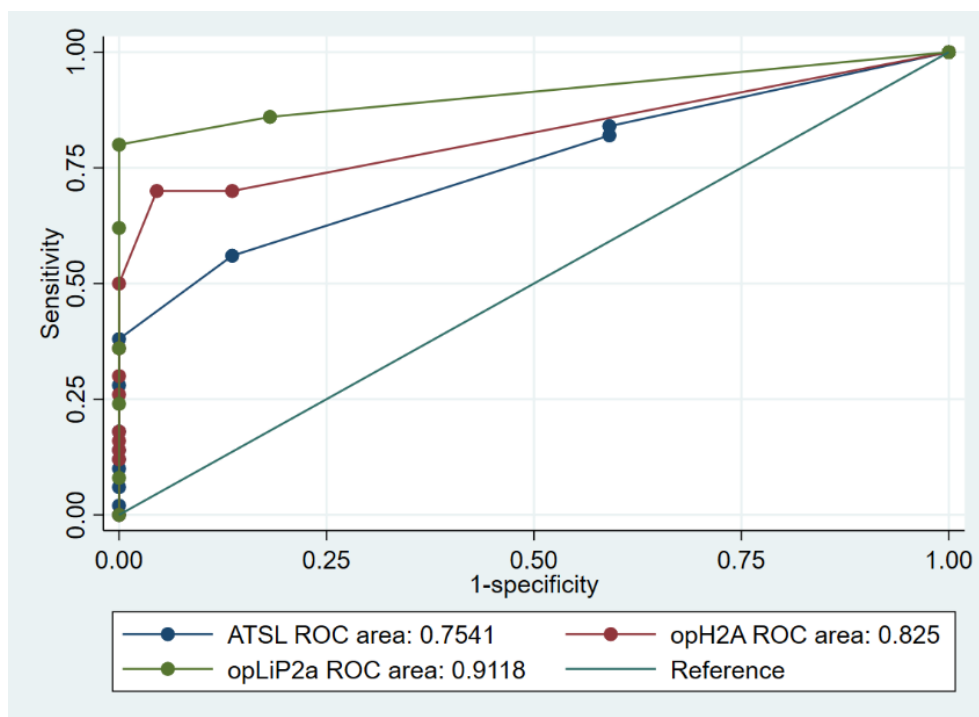
Para determinar un valor de punto corte (cut off) óptimo de los antígenos (ATSL, opH2A y opLiP2a) evaluados con sueros de un área endémica de la enfermedad, se consideró que este cerca al mayor valor de índice de Youden “ γ ” y una especificidad mayor al 90%; se estableció como punto de corte para ATSL una puntuación visual de ≥ 2 ($\gamma = 0.4222$) y para los péptidos opH2A ($\gamma = 0.2948$) y opLiP2a ($\gamma = 0.5657$) un punto de corte de ≥ 3 . En el caso de un área no endémica se consideró como criterio de selección de un punto de corte, el valor que favorezca una especificidad del 100 %; tanto en las pruebas de opLiP2a ($\gamma = 0.800$) y opH2A ($\gamma = 0.500$) se establecieron una puntuación visual de ≥ 2 , esto fue menor al punto de corte seleccionado en los mismos antígenos en un área

endémica, sin embargo, en el análisis de ATSL ($\gamma = 0.380$) ocurrió lo contrario, donde se tiene un aumento en el punto de corte, teniendo para este antígeno una puntuación visual de ≥ 3 .



	ROC area	Std. err.	chi2	df	Pr>chi2
ATSL (standard)	0.8234	0.0370			
opH2A	0.7300	0.0436	5.0003	1	0.0253
opLiP2a	0.8390	0.0389	0.1196	1	0.7295

Figura N°15: Curva ROC y AUC de la puntuación visual de la prueba LFA de ATSL, opH2A y opLiP2a, con un panel de muestras de individuos sanos de área endémica



	ROC area	Std. err.	chi2	df	Pr>chi2	Bonferroni Pr>chi2
ATSL (standard)	0.7541	0.0533				
opH2A	0.8250	0.0395	1.5889	1	0.2075	0.4150
opLiP2a	0.9118	0.0303	7.4732	1	0.0063	0.0125

Figura N°16: Curva ROC y AUC de la puntuación visual de la prueba LFA de ATSL, opH2A y opLiP2a, con un panel de muestras de individuos sanos de área no endémica.

7.5.2. Determinación del punto de corte y área bajo la curva de la intensidad relativa - porcentaje de positividad (PP%) de la prueba LFA

Se utilizaron las mismas pruebas de LFA en las que se evaluó por puntuación visual para procesarlas digitalmente a través del programa Image Lab 6.1 (BIO RAD), de cada prueba se obtuvo la intensidad relativa (línea de prueba/control), posteriormente, estos valores fueron representados en términos de porcentaje de

positividad en base al control positivo. La curva ROC de ATSL, opH2A y opLiP2a, se elaboró para 92 muestras de individuos sanos de áreas endémicas y otra curva ROC para 22 muestras de suero de individuos sanos de áreas no endémicas con los mismos antígenos, en ambos casos se consideró 50 muestras de pacientes con leishmaniasis cutánea.

- **Análisis basado en Intensidad relativa**

El área bajo la curva (AUC) de opLiP2a presentó una buena capacidad discriminativa entre los pacientes positivos a leishmaniasis cutánea e individuos negativos de un área endémica, teniendo un valor de 0.852 (IC 95% 0.779 - 0.926), de acuerdo a la prueba chi cuadrado opLiP2a presentó una diferencia significativa con el AUC de ATSL que tiene un valor de 0.723 (IC 95% 0.618 – 0.827), a comparación de los dos antígenos, el opH2A presentó un menor AUC con 0.692 (IC 95% 0.590 – 0.827). Para las muestras de un área no endémica se observó una similar tendencia en el desempeño de la prueba LFA descrito en un área endémica, donde el mayor valor de AUC es 0.890 (IC 95% 0.815 – 0.965) para opLiP2a, seguido de 0.700 (IC 95% 0.578 - 0.822) de ATSL y 0.654 (IC 95% 0.530 – 0.777) de opH2A.

Para las pruebas de LFA analizadas por su intensidad relativa, se seleccionaron los puntos de corte que prioricen una especificidad mayor al 90% y que maximicen el valor del índice de Youden “ γ ”. En un área endémica, las pruebas de LFA que utilizan ATSL, opH2A y opLiP2a se establecieron como punto de corte 0.13664 ($\gamma = 0.493$), 0.0393 ($\gamma = 0.427$) y 0.0812 ($\gamma = 0.595$), respectivamente. En el caso de un área no endémica se tiene un aumento en el punto de corte en las

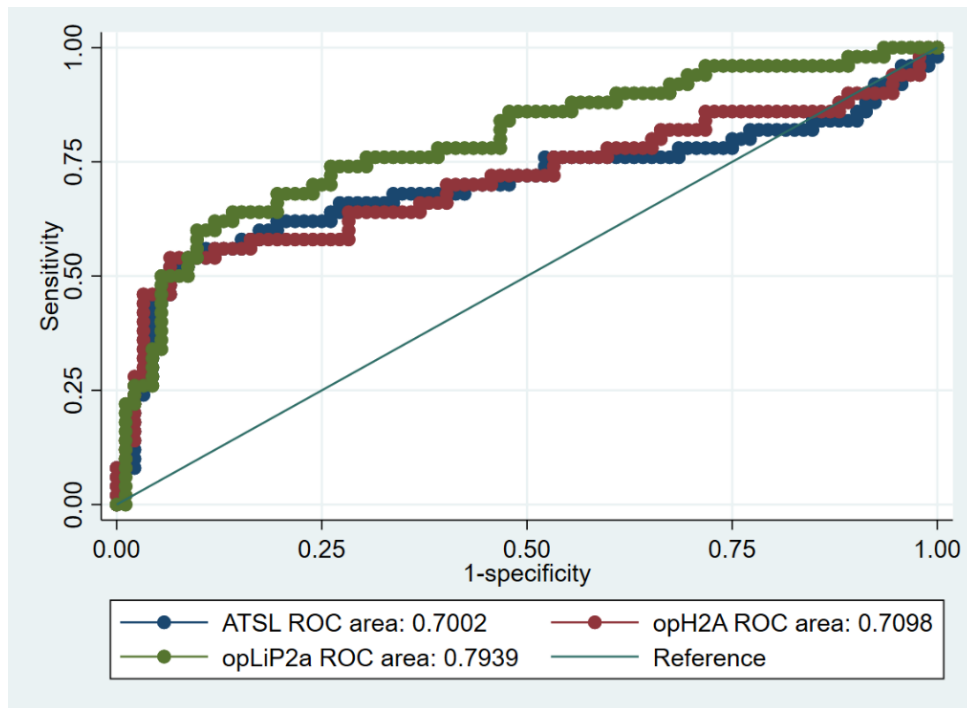
pruebas de ATSL (0.1569; $\gamma = 0.449$) y opH2A (0.0429; $\gamma = 0.420$) con respecto a un área endémica, sin embargo, en opLiP2a se observó lo contrario, con un punto de corte de 0.0693 ($\gamma = 0.720$).

- **Análisis basado en Porcentaje de Positividad (PP%)**

Dentro de un área endémica (Figura N°17), se obtuvo valores de AUC que no tienen una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las pruebas ATSL (AUC = 0.7002; IC 95% 0.595 - 0.805), opH2A (AUC = 0.6783; IC 95% 0.575 - 0.781) y opLiP2a (AUC = 0.7939; IC 95% 0.713 – 0.875), los valores obtenidos de ATSL y opLiP2a representan una capacidad discriminativa aceptable para diagnosticar leishmaniasis. En el panel de muestras de suero que incluye el área no endémica (Figura N°18), se observó una excelente capacidad discriminativa en la prueba de opLiP2a, que tiene AUC de 0.9373 (IC 95% 0.880 – 0.995), además este presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con la prueba de ATSL (AUC = 0.7318; IC 95% 0.618 – 0.846), sin embargo, el antígeno opH2A tiene un menor AUC de 0.6745 (IC 95% 0.554 – 0.795), que no presenta diferencia significativa con ATSL.

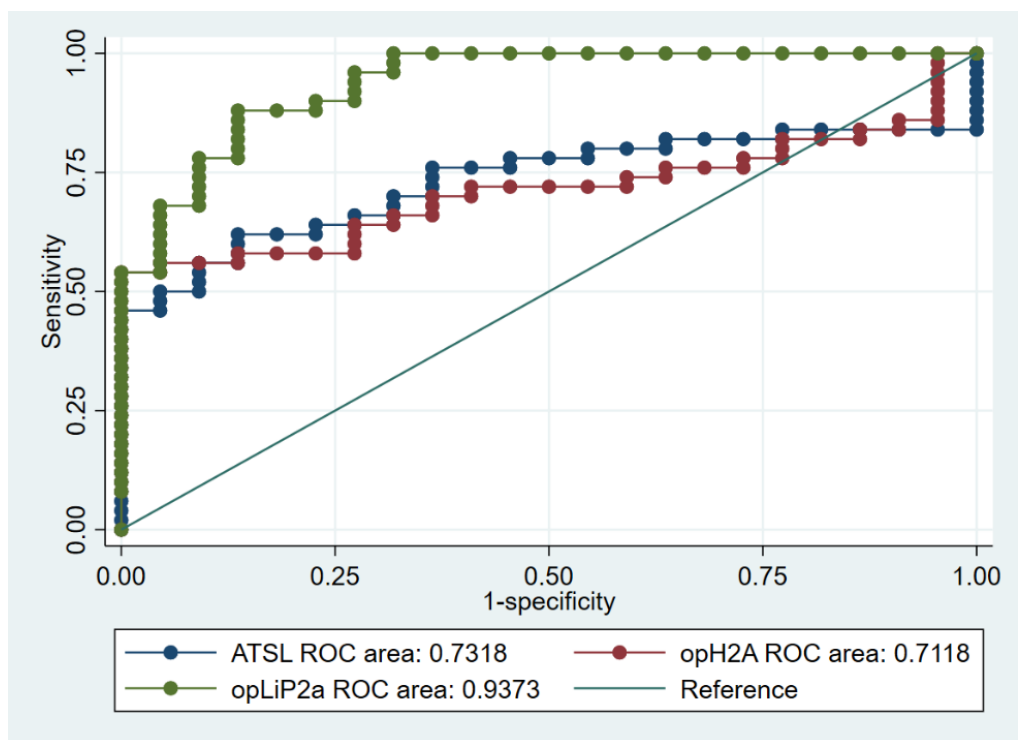
En la selección de punto de corte del porcentaje de positividad (PP) de las pruebas de LFA para un área endémica, se consideró una mayor o igual especificidad con respecto a la prueba analizada por intensidad relativa, correspondiendo para ATSL un punto de corte de $\geq 37.86\%$ ($\gamma = 0.4530$), para opH2A de ≥ 13.49 ($\gamma = 0.347$) y para opLiP2a ≥ 32.44 ($\gamma = 0.4457$). En el caso de un área no endémica, adicionalmente se tomó en cuenta un valor cercano al punto de corte determinado para los mismos antígenos analizados en un área endémica, es así que se

establecieron los valores de $\geq 33.69\%$ ($\gamma = 0.4691$), 10.50% ($\gamma = 0.4800$) y 29.9891% ($\gamma = 0.5400$) como puntos de corte para ATSL, opH2A y opLiP2a, respectivamente.



	ROC area	Std. err.	chi2	df	Pr>chi2
ATSL (standard)	0.7002	0.0537			
opH2A	0.7098	0.0517	0.0176	1	0.8944
opLiP2a	0.7939	0.0414	2.4071	1	0.1208

Figura N°17: Curva ROC y AUC de la intensidad en porcentaje de positividad (PP%) de la prueba LFA de ATSL, opH2A y opLiP2a, con un panel de muestras de individuos sanos de área endémica.



	ROC area	Std. err.	chi2	df	Pr>chi2
ATSL (standard)	0.7318	0.0581			
opH2A	0.7118	0.0592	0.0572	1	0.8109
opLiP2a	0.9373	0.0293	10.9972	1	0.0009

Figura N°18: Curva ROC y AUC de la intensidad en porcentaje de positividad (PP%) de la prueba LFA de ATSL, opH2A y opLiP2a, con un panel de muestras de individuos sanos de área no endémicas.

7.5.3. Rendimiento de la prueba rápida en formato LFA

A. Serodiagnóstico de leishmaniasis cutánea (LC) en un área endémica (E)

Las características diagnosticas del antígeno total soluble (ATSL), opH2A y opLiP2a de la prueba rápida en formato LFA (puntuación visual e intensidad – PP) se contrastaron con la prueba de ELISA que utiliza los mismos antígenos.

El serodiagnóstico de 50 pacientes con LC con la prueba LFA que utiliza antígeno total (ATSL), no se observa una variación en los valores de sensibilidad entre la puntuación visual, intensidad relativa y porcentaje de positividad (PP%) presentando 56.0%, 58.0% y 54%, respectivamente; sin embargo, cuando se compara la prueba LFA con la a prueba de ELISA, este último refleja un incremento en la sensibilidad de 70.0%. En cuanto al antígeno opH2A, se observa una mayor sensibilidad en la prueba de LFA con un valor de 46.0% cuando es medido por intensidad relativa, sin embargo, cuando se normaliza a porcentaje de positividad se tiene una disminución en la sensibilidad a 38.0%, este último tiene un valor de sensibilidad cercano al 36.0 % de la misma prueba medida por puntuación visual; considerando estos dos últimos análisis de la prueba LFA, no se observa una variación en la sensibilidad con respecto a la prueba de ELISA que utiliza opH2A que tiene 34.0% de sensibilidad. En el antígeno opLiP2a utilizado en la prueba LFA refleja mayor sensibilidad cuando es medido por puntuación visual (62.0%) e intensidad relativa (66.0), este último al ser analizado en porcentaje de positividad se tiene una sensibilidad de 50.0%, cuyo valor es comparable a la prueba de ELISA del mismo antígeno (54.0%).

En el análisis de 92 muestras de suero de individuos sanos de áreas endémicas como control negativo, se tiene en las pruebas de ELISA y LFA que usan ATSL especificidades que están entre 90.2% y 91.3%. Para la prueba de LFA que utiliza opH2A, se observa un incremento relativo de la especificidad cuando es analizado por puntuación visual (93.5%), intensidad relativa (94.6%) y porcentaje de positividad (96.7%), con respecto a la prueba de ELISA (92.4%) del mismo

antígeno. Por otro lado, opLiP2a tiene la misma especificidad de 94.6, en las pruebas de LFA (puntuación visual y porcentaje de positividad) y ELISA.

B. Serodiagnóstico de leishmaniasis cutánea (LC) en un área no endémica (NE)

Para los antígenos evaluados, se seleccionaron puntos de corte que favorezcan una mayor especificidad y sensibilidad (Índice de Youden), en general se observó un buen rendimiento diagnóstico de los antígenos en un área no endémica con respecto a un área endémica. El antígeno total (ATSL) utilizado en la prueba de ELISA llegó a detectar 42 muestras de suero con LC de las 50 muestras evaluadas, mostrando una alta sensibilidad (84.0%) con respecto a la prueba de LFA, por otro lado, dentro de la prueba LFA cuando se mide por puntuación visual, este refleja una sensibilidad de 38.0 % siendo menor a la intensidad relativa y porcentaje de positividad, los cuales presentan sensibilidades de 54.0% y 56.0%, respectivamente. En el caso de opH2A se observó el mismo efecto, visto en ATSL, donde la prueba de ELISA que usa opH2A tiene una sensibilidad del 72.0%, a diferencia de la prueba de LFA cuando es medido por puntuación visual (50.0%), seguido de la intensidad relativa (42.0%) y porcentaje de positividad (48.0%). En cuanto al antígeno opLiP2a la sensibilidad de la prueba de ELISA que da 82.0% se mantiene en la prueba de LFA medido por puntuación visual (80.0%) pero cuando la misma prueba se mide por intensidad relativa la sensibilidad disminuye a 72.0% y estos al ser normalizados en porcentaje de positividad llega a una sensibilidad de 54.0%.

La especificidad de ATSL fue de 100.0% en la prueba de ELISA, y se mantiene en la prueba de LFA medido por puntuación visual (100.0 %), sin embargo, la especificidad es menor cuando se analiza por intensidad relativa (90.9%) y porcentaje de positividad (90.9%). En el caso de la especificidad de las pruebas de LFA y ELISA que utilizan opH2A y opLiP2a no presento diferencia y todos presentaron un valor de 100.0%, además que estos presentaron una especificidad mayor con respecto a la zona endémica.

Tabla N° 1: Características diagnósticas de los antígenos opH2A y ATSL para LC vs. controles sanos endémicos (E)

Prueba serodiagnóstica		Antígeno	VP	VN	FP	FN	Sensibilidad (%)	IC 95%	Especificidad (%)	IC 95%	PPV	NPV
ELISA		ATSL	35	83	9	15	70.0	62.5 – 77.5	90.2	85.3 – 95.1	79.5	84.7
		opH2A	17	85	7	33	34.0	26.2 – 41.8	92.4	88.0 – 96.7	70.8	72.0
		opLiP2a	27	87	5	23	54.0	45.8 – 62.2	94.6	90.8 – 98.3	84.4	79.1
LFA	Puntuación visual	ATSL	28	83	9	22	56.0	47.8 – 64.2	90.2	85.3 – 95.1	75.7	79.0
		opH2A	18	86	6	32	36.0	28.1 – 43.9	93.5	89.4 – 97.5	75.0	72.9
		opLiP2a	31	87	5	19	62.0	54.0 – 69.9	94.6	90.8 – 98.3	86.1	82.1
	Intensidad Relativa	ATSL	29	84	8	21	58.0	49.9 – 66.1	91.3	86.7 – 95.9	78.4	80.0
		opH2A	23	89	3	27	46.0	37.8 – 54.2	96.7	93.8 – 99.6	83.9	78.4
		opLiP2a	33	86	6	17	66.0	58.2 – 73.8	93.5	89.4 – 97.5	84.6	83.5
	Intensidad (PP)	ATSL	27	84	8	23	54.0	45.8 – 62.2	91.3	86.7 – 95.9	77.1	78.5
		opH2A	19	89	3	31	38.0	30.0 – 45.9	96.7	93.8 – 99.7	86.4	74.2
		opLiP2a	25	87	5	25	50.0	41.8 – 58.2	94.6	90.8 – 98.3	83.3	77.7

Tabla N° 2: Características diagnósticas de los antígenos opH2A y ATSL para LC vs. controles sanos no endémicos (NE)

Prueba serodiagnóstica		Antígeno	VP	VN	FP	FN	Sensibilidad (%)	IC 95%	Especificidad (%)	IC 95%	PPV	NPV
ELISA		ATSL	42	22	0	8	84.0	75.5 – 92.5	100.0	100.0 – 100.0	100.0	73.3
		opH2A	36	22	0	14	72.0	61.6 – 82.4	100.0	100.0 – 100.0	100.0	61.1
		opLiP2a	41	22	0	9	82.0	73.1 – 90.9	100.0	100.0 – 100.0	100.0	70.9
LFA	Puntuación visual	ATSL	19	22	0	31	38.0	26.8 – 49.2	100.0	100.0 – 100.0	100.0	30.1
		opH2A	25	22	0	25	50.0	38.4 – 61.5	100.0	100.0 – 100.0	100.0	46.8
		opLiP2a	40	22	0	10	80.0	70.8 – 89.2	100.0	100.0 – 100.0	100.0	68.75
	Intensidad Relativa	ATSL	27	20	2	23	54.0	42.5 – 65.5	90.9	84.2 – 97.5	87.2	34.9
		opH2A	21	22	0	29	42.0	30.6 – 53.4	100.0	100.0 – 100.0	100.0	43.1
		opLiP2a	36	22	0	14	72.0	61.6 – 82.4	100.0	100.0 – 100.0	100.0	61.1
	Intensidad (PP)	ATSL	28	20	2	22	56.0	44.5 – 67.5	90.9	84.3 – 97.5	93.3	47.6
		opH2A	24	22	0	26	48.0	36.5 – 59.5	100.0	100.0 – 100.0	100.0	34.2
		opLiP2a	27	22	0	23	54.0	42.5 – 65.5	100.0	100.0 – 100.0	100.0	37.3

Figura N°19: Puntuaciones de muestras evaluadas en LFA con los antígenos ATSL y opH2A

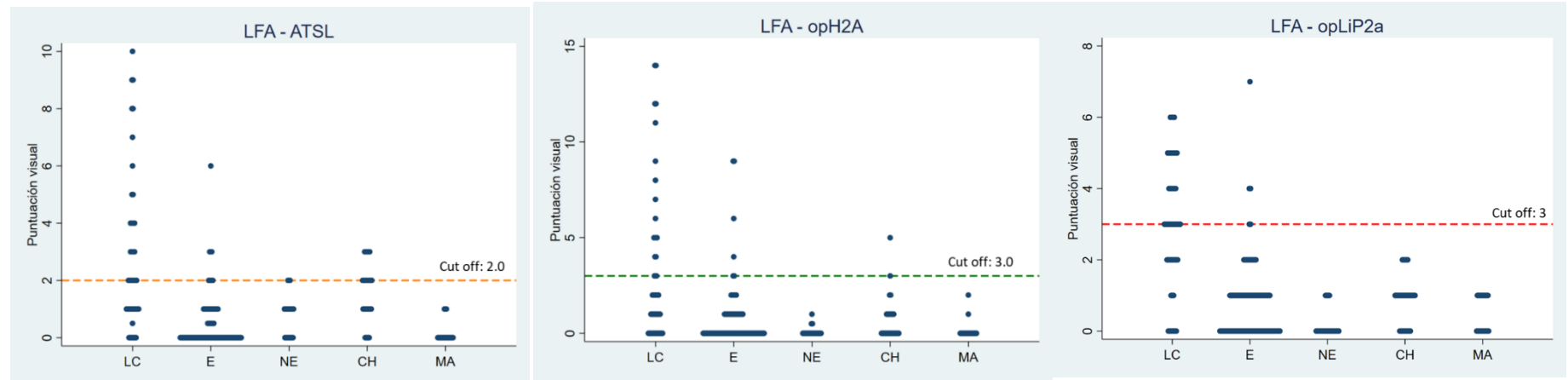


Figura N°20: Intensidad relativa de muestras evaluadas en LFA con los antígenos ATSL y opH2A

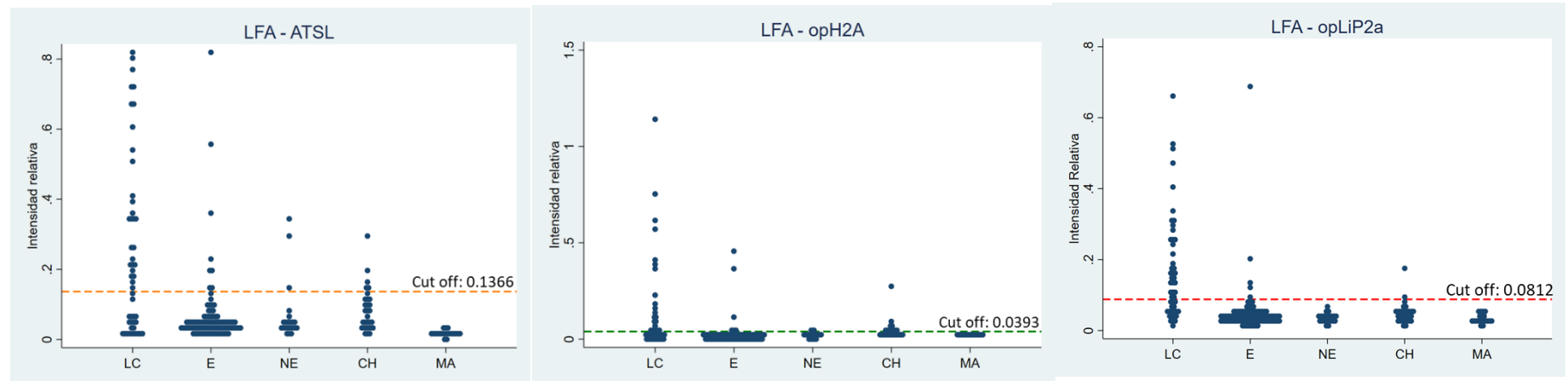
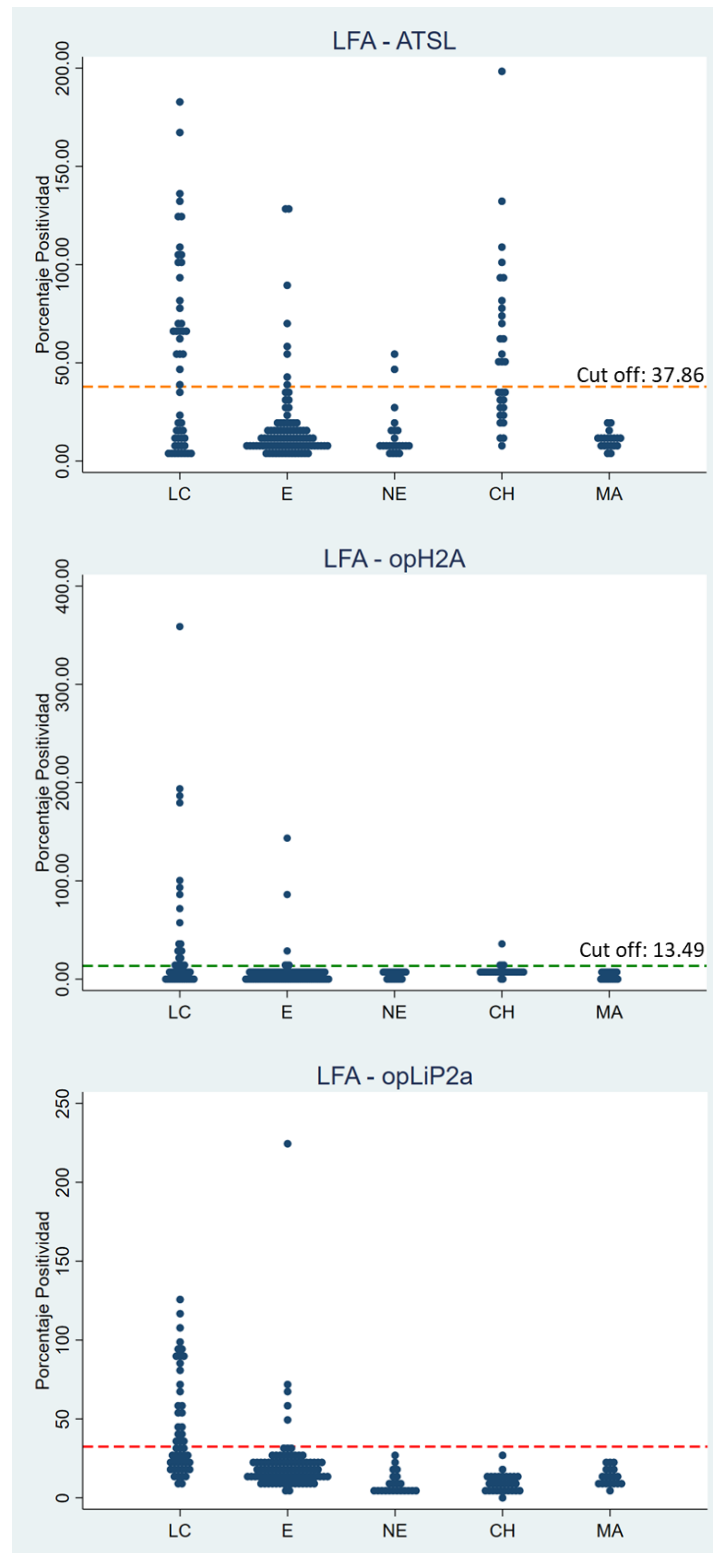


Figura N°21: Intensidad - porcentaje de positividad de muestras evaluadas en LFA con los antígenos ATSL y opH2A



7.5.4. Reactividad cruzada con otras enfermedades

Se analizó 30 muestras de suero de pacientes con Chagas y 19 sueros de pacientes con malaria, se utilizó como punto de corte en cada prueba de diagnóstico, el valor establecido para un área endémica (Tabla N°3). La prueba LFA que utiliza antígeno total (ATSL), presentó para la puntuación visual una reactividad cruzada en 16 pacientes con Chagas (53.3%), este valor fue el mismo cuando se analiza a nivel de porcentaje de positividad, sin embargo antes de normalizar los datos a porcentaje de positividad, la intensidad relativa refleja una reactividad en 5 pacientes (16.7%); en el caso de la prueba de ELISA que utiliza ATSL mostró un mayor número de pacientes con Chagas que tienen reactividad cruzada (n=29; 96.7%). Para opH2A se detectó la reactividad en la prueba LFA por intensidad relativa en 8 pacientes con Chagas (26.7%), sin embargo, cuando se normaliza a porcentaje de positividad se tiene dos pacientes con reactividad cruzada con Chagas (6.7%), este último resultado fue el mismo para la puntuación visual; en el caso de la prueba ELISA en contraste con la prueba de LFA que usan opH2A, no se detecta la reactividad cruzada con los pacientes de Chagas (0%). En el análisis de opLiP2a no se observó reactividad cruzada con ningún paciente de Chagas en las pruebas de ELISA y LFA (puntuación visual y PP%), excepto en la prueba LFA donde solo es analizado por intensidad relativa que tiene una reactividad en dos pacientes con Chagas (6.7%). Finalmente, las pruebas serodiagnósticas (LFA y ELISA) que tienen los antígenos ATSL, opH2A y opLiP2a, evaluados en pacientes diagnosticados con malaria (Tabla N°3), no mostraron reactividad cruzada (n=0; 0%).

Tabla N°3: Reactividad cruzada a antígeno con enfermedades infecciosas

Enfermedad			Chagas (N = 30)		Malaria (N = 19)	
			n	%	n	%
ELISA		ATSL	29	96.7	0	0
		opH2A	0	0	0	0
		opLiP2a	0	0	0	0
LFA	Puntuación visual	ATSL	16	53.3	0	0
		opH2A	2	6.7	0	0
		opLiP2a	0	0	0	0
	Intensidad relativa	ATSL	5	16.7	0	0
		opH2A	8	26.7	0	0
		opLiP2a	2	6.7	0	0
	Intensidad PP%	ATSL	16	53.3	0	0
		opH2A	2	6.7	0	0
		opLiP2a	0	0	0	0
		ATSL	16	53.3	0	0
		opH2A	2	6.7	0	0
		opLiP2a	0	0	0	0

7.6. Comparación de la prueba de LFA vs ELISA en cada antígeno

Se analizó el grado de concordancia entre las pruebas de LFA y ELISA para el antígeno total (ATSL), opH2A y opLiP2a, en las 164 muestras serológicas (Tabla N°4). Para ATSL, ambas pruebas serológicas estuvieron de acuerdo en un rango 83.54 % – 85.37%, lo que significa que entre 137 a 140 de los sueros tuvieron un acuerdo entre las dos pruebas, el cálculo del índice Kappa de Cohen indica un acuerdo sustancial cuando es medido por la puntuación visual ($k=0.6162$) y un acuerdo moderado cuando es analizado por intensidad relativa ($k=0.5842$) y porcentaje de positividad ($k=0.5584$). En el antígeno opH2A, cuando se compara

la prueba LFA en sus diferentes análisis en referencia a la prueba de ELISA, se obtuvo un acuerdo observado entre 149 a 152 (90.85% - 92.68%) y se tiene como valores de kappa 0.6583, 0.652 y 0.6967 para la puntuación visual, intensidad relativa y porcentaje de positividad, respectivamente; estos valores representan una fuerza de acuerdo sustancial. En el caso de opLiP2a ambas pruebas serológicas se observó un acuerdo de 150 a 152 muestras (91.46 % – 92.68%) y en los resultados de Kappa de Cohen mostraron un acuerdo sustancial consistente entre la prueba de LFA en el análisis de puntuación visual ($k=0.7776$), intensidad relativa ($k=0.7669$) y porcentaje de positividad ($k=0.7216$) con la prueba de ELISA.

Tabla N°4: Análisis de concordancia entre las pruebas serológicas (ELISA y LFA) en referencia a los antígenos (ATSL, opH2A y opLiP2a).

Prueba serodiagnóstica		ELISA							
				Negativo	Positivo	Acuerdo observado %	Acuerdo esperado %	Kappa	Error Estándar
Antígeno				ATSL					
LFA	ATSL	Puntuación visual	Negativo	110	14				
			Positivo	10	30	85.37	61.87	0.6162	0.0779
		Intensidad Relativa	Negativo	109	15				
			Positivo	11	29	84.15	61.87	0.5842	0.0779
	opH2A	PP%	Negativo	110	17				
			Positivo	10	27	83.54	62.72	0.5584	0.0776
		Puntuación visual	opH2A						
			Negativo	133	7				
	opLiP2a	Intensidad Relativa	Positivo	7	17	91.46	75.01	0.6583	0.0781
			Negativo	131	6				
		PP%	Positivo	9	18	90.85	73.72	0.652	0.0779
			Negativo	135	7				
	opLiP2a	Puntuación visual	Positivo	5	17	92.68	75.88	0.6967	0.078
			opLiP2a						
		Intensidad Relativa	Negativo	124	4				
			Positivo	8	28	92.68	67.10	0.7776	0.0779
	opLiP2a	PP%	Negativo	122	3				
			Positivo	10	29	92.07	65.99	0.7669	0.0775
	opLiP2a	PP%	Negativo	126	8				
			Positivo	6	24	91.46	69.33	0.7216	0.0780

7.7. Comparación entre los antígenos opH2A y opLiP2a de la prueba LFA

Las pruebas LFA que fueron evaluadas en 164 muestras de suero, teniendo como primer análisis la puntuación visual, se observó una correlación positiva razonable ($\rho = 0.5282$) entre los antígenos opH2A y opLiP2a, que fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$); así mismo dentro de este panel total de muestras, 50 pacientes con leishmaniasis detectado por PCR, presentaron una correlación positiva razonable ($\rho = 0.399$; $p < 0.05$) entre los antígenos, sin embargo, cuando se toma las muestras de individuos sanos ($n=114$) presentaron una pobre correlación positiva ($\rho = 0.2828$; $p < 0.05$) entre los antígenos. En cuanto al análisis por intensidad relativa y su normalización a porcentaje de positividad (PP) del total de las muestras de suero, se observó un ρ de 0.2522 y 0.1976, lo que representa una pobre correlación positiva entre opH2A y opLiP2a, en ambos análisis ($p < 0.05$); de estos las muestras en las que se detectó leishmaniasis presentan una correlación positiva razonable ($\rho = 0.3197$; $p < 0.05$) a una correlación positiva pobre ($\rho = 0.1821$; $p > 0.05$) en intensidad relativa y porcentaje de positividad, respectivamente, por otro lado las muestras de individuos sanos no tienen ninguna correlación en ambos antígenos, tanto en el análisis de intensidad relativa ($\rho = 0.00051$) y porcentaje de positividad ($\rho = -0.0363$), la correlación no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Se determinó el Coeficiente de Correlación Intraclass (CCI) entre los antígenos opH2A y opLiP2a implementados en el formato LFA. En el análisis de la puntuación visual, se observó un acuerdo substancial ($CCI = 0.6325$) entre los dos antígenos en todas las muestras de suero que fueron evaluadas, de estas muestras el grupo de pacientes en las que se detectó leishmaniasis presentaron un acuerdo

justo ($CCI = 0.3909$) y el otro grupo de muestras de individuos sanos tienen un acuerdo moderado ($CCI=0.6017$). Por otro lado en el análisis de la intensidad relativa y porcentaje de positividad se observó una diferencia en el total de las muestras entre los dos antígenos, donde el primero tiene un acuerdo moderado con un CCI de 0.5063 y el segundo un acuerdo justo con un CCI de 0.3021; la intensidad relativa tanto en las muestras en las que se detectó leishmaniasis ($CCI=0.3656$) como los individuos sanos ($CCI=0.3208$) tienen un acuerdo justo entre los antígenos a diferencia del porcentaje de positividad, donde las muestras con leishmaniasis no mostraron un acuerdo ($CCI=0.0649$) y las muestras de individuos sanos llegaron a tener un ligero acuerdo ($CCI=0.2645$).

También se analizó el grado de concordancia entre los antígenos opH2A y opLiP2a, considerando que las muestras de suero fueron clasificadas en positivos y negativos de acuerdo al punto de corte definido en cada análisis (puntuación visual, intensidad relativa y porcentaje de positividad). Para los tres análisis en las 164 muestras serológicas, los antígenos opH2A y opLiP2a estuvieron de acuerdo en un 84.15% con un índice de Kappa de Cohen de 0.4744, 0.5109 y 0.4084, respectivamente, estos valores indican un acuerdo moderado entre los dos antígenos. Cuando se utiliza solo los 50 sueros de pacientes con leishmaniasis detectado por PCR convencional, tanto la puntuación visual y la intensidad relativa tienen un acuerdo observado en 29 y 30 sueros, respectivamente, con un índice de Kappa de Cohen de 0.2129 y 0.22 que indican un acuerdo justo entre los dos antígenos, en el caso porcentaje de positividad se tiene un acuerdo observado de 28 sueros, con un índice de Kappa de Cohen de 0.12 lo que representa un leve acuerdo entre los antígenos. Finalmente, de los 114 sueros de individuos sanos,

presentaron un acuerdo observado de 109, 108 y 110 los análisis de puntuación visual ($k=0.5226$), intensidad relativa ($k=0.3736$) y porcentaje de positividad ($k=0.483$) (Tabla N°5; para más detalle sobre el análisis de Kappa de Cohen ver Anexo).

Tabla N°5: Análisis de grado de correlación y concordancia entre los antígenos (opH2A y opLiP2a)

Prueba LFA opH2A y opLiP2a	Muestras	Puntuación visual	Intensidad Relativa	PP%
Correlación Spearman - rho ($p<0.05$)	Leishmaniasis-PCR (n=50)	0.399	0.3197	0.1821*
	Individuos sanos (n=114)	0.2828	0.0051*	-0.0363*
	Total (n=164)	0.5282	0.2522	0.1976
CCI	Leishmaniasis-PCR (n=50)	0.3909882	0.3656224	0.0649195
	Individuos sanos (n=114)	0.6017901	0.3208641	0.26454
	Total (n=164)	0.6325295	0.5063445	0.3021339
Kappa	Leishmaniasis-PCR (n=50)	0.2129	0.22	0.12
	Individuos sanos (n=114)	0.5226	0.3736	0.483
	Total (n=164)	0.4744	0.5109	0.4084

* $p>0.05$

VIII. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que utiliza oligopéptidos en una prueba de Lateral Flow Assay (LFA), para el serodiagnóstico de Leishmaniasis cutánea (LC) del nuevo mundo. Previamente se ha identificado dos péptidos antigénicos de *L.infantum*, uno derivado de la proteína histona H2A (opH2A) y el otro que corresponde a un derivado de la proteína ácida ribosomal (opLiP2a), ambos antígenos mostraron un buen desempeño para el diagnóstico serológico de LC en el formato de ELISA indirecto (Arevalo J, 2015; Valdivia-Francia, 2018) sin embargo, el empleo de este método como herramienta de serodiagnóstico, no es factible para su aplicación en los POCs, por lo que motivó a la transferencia de estos antígenos al formato LFA.

El desarrollo de las pruebas rápidas en formato LFA depende en gran medida de la inmovilización del agente de captura tanto en la línea de prueba (ATSL, opH2A y opLiP2a) y línea control (IgG anticabra). Se tiene un conocimiento limitado sobre el mecanismo que implica la interacción del anticuerpo con la nitrocelulosa sin embargo este ha sido la proteína más usada en ensayos de flujo lateral (O'Farrell, 2009), en nuestro estudio la fijación del anticuerpo IgG anticabra en nitrocelulosa como línea de control de la prueba LFA, presentó una disminución entre 40% y 50% de intensidad de acuerdo a la prueba de eficiencia de inmovilización, lo que refleja una pérdida del anticuerpo durante la etapa de lavado (PBST), a pesar de esta pérdida, este puede reconocer el anticuerpo antihumano conjugado con HRP u Oro coloidal producido en cabra, esta interacción que tiene lugar en la línea de control, presenta una señal alta e incluso mayor a la intensidad de la línea de prueba donde se encuentra el antígeno. En un

estudio en el que se evaluó la influencia de la urea, las sales y el Tween 20 en la adsorción de IgG canina en nitrocelulosa, mostró que a altas concentraciones de sal y urea, podría estabilizar las interacciones proteína-membrana (De Castro, et al., 2022), en nuestro caso para la fijación de IgG anticabra se utilizó un buffer con baja concentración de sales (PBS, pH 7.4) , esto podría influir en la pérdida del anticuerpo IgG anticabra al no favorecer las condiciones óptimas en la retención del anticuerpo en la nitrocelulosa.

Para la línea de prueba que tiene como blanco de fijación al antígeno total soluble de *Leishmania* (ATSL), fue evaluado a diferentes concentraciones. La primera observación estuvo limitada a la sensibilidad del Coomassie que reacciona con el antígeno total fijado en la membrana de nitrocelulosa, siendo los puntos dispensados visiblemente detectados cuando se tiene a una concentración de 200 µg/mL, la presencia de ATSL en la membrana por debajo de la concentración mencionada, se confirmó con la prueba de funcionalidad HRP- DAB (Dot blot), su alta sensibilidad permitió visualizar una señal baja a la concentración de 50 µg/mL este correspondería a 0.025 µg de antígeno total dispensado en un punto de la membrana de nitrocelulosa. En un estudio en el que se desarrolló una tira reactiva para la detección de anticuerpos caninos específicos de *Leishmania*, se obtuvo una concentración óptima del antígeno total de *L.infantum* a 750 µg/mL, donde los controles negativos fueron negativos y los sueros de perros con casos sospechosos, con casos sintomáticos y confirmados dieron positivo con la tira reactiva (Schallig, et al., 2004), en nuestro estudio el óptimo fue a una concentración de 200 µg/mL de ATSL para el ensayo de Dot blot, considerando que a esta concentración no se observa reactividad en el control negativo y blanco

(sin suero), sin embargo para el formato final de la prueba LFA que utiliza el oro coloidal como detección, se consideró la concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, para mantener la sensibilidad y especificidad analítica. En el presente trabajo no se realizó una exploración exhaustiva de la fijación de ATSL ya que, a las condiciones de trabajo, se encontró aparentemente el óptimo para su evaluación en el diagnóstico serológico de LC.

Los otros blancos de fijación en la línea de prueba, son los péptidos opH2A (12 aminoácidos) y opLiP2a (20 aminoácidos) que fueron transferidos al formato LFA de manera independiente; de acuerdo a nuestras condiciones de trabajo, una fijación directa de los péptidos a la nitrocelulosa no fue posible y esto posiblemente a que uno de los factores que interviene en la inmovilización de agentes en la membrana, es el tamaño, lo que significa que a mayor tamaño, aumenta la superficie de interacción con la membrana de nitrocelulosa. La inmovilización a través del enlace de afinidad como la interacción estreptavidina-biotina es muy eficaz para orientar las proteínas inmovilizadas sobre la superficie de la membrana (Chivers, et al., 2011). El uso de este sistema de interacción, facilita la inmovilización de los péptidos biotinilados en la membrana de nitrocelulosa. Los primeros resultados se obtuvieron principalmente en una membrana de nitrocelulosa que es usada comúnmente en ensayos de Western Blot; la disponibilidad de este producto, así como su facilidad de uso en nuestro diseño experimental permitió obtener las condiciones óptimas de fijación de estreptavidina en nitrocelulosa, finalmente la experiencia generada permitió pasar al uso de matrices de nitrocelulosa Whatman/GE que están disponibles comercialmente para el desarrollo de pruebas rápidas. La exploración de las

condiciones de pH optimo en la fijación del sistema estreptavidina- opLiP2a biotinilado, se dio en el buffer Acetato pH 5.0, mostrando una buena retención en nitrocelulosa de acuerdo a la prueba de eficiencia de inmovilización y confirmándose la funcionalidad con la prueba de Dot Blot, este último presento una alta señal de detección del inmunocomplejo; por otro lado cuando la concentración fue mayor a 200 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina, se llegó a observar reactividad en el suero control negativo, lo que permitió definir las condiciones requeridas para tener una respuesta específica. Este mismo enfoque de fijación se utilizó en el péptido opH2A-biotinilado, los resultados fueron similares (Datos no publicados). Este es el primer estudio que utiliza diferentes condiciones de pH para la fijación de estreptavidina en nitrocelulosa, previamente se reportó la fijación de estreptavidina en PBS, cuando se utilizó la matriz de nitrocelulosa Millipore HFB135 no evidencio la interacción de estos componentes que fueron sometidos a una solución de desafío ($\text{PBST}_{0.02}$) y cuando se trabajó con la matriz GE FF080HP mostró una baja interacción (Holstein, et al., 2016), en nuestro estudio se confirma la baja interacción de estreptavidina utilizando PBS, con respecto al pH optimo de fijación encontrando, aparentemente la interacción con nitrocelulosa seria afectado por el punto isoeléctrico (pI) de la estreptavidina, lo que podría ser explicado por el modelo teórico de adsorción de proteínas a nitrocelulosa de Přistoupil que indica que la proteína que está en su punto isoeléctrico presenta tanto carga negativa y positiva lo que facilita la interacción con la nitrocelulosa (Přistoupil, et al., 1969), por otro lado el buffer fosfato pH 5.0 también permite llegar al pI de estreptavidina, donde se observó una alta retención

de estreptavidina a 500 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo tuvo una baja señal de detección en la prueba de funcionalidad (Dot Blot).

En particular, los pruebas LFA basados en nitrocelulosa a menudo se tratan previamente con una solución de bloqueo que contiene proteínas para llenar los sitios de unión no utilizados y así evitar que el analito de la muestra se adsorba de manera no específica a la membrana antes de que pueda alcanzar la línea de captura (Fridley, 2013), en este estudio durante el desarrollo de la prueba LFA se observó una alta señal de fondo y baja reactividad en la línea de prueba en la detección con el oro coloidal o nanoshell de oro cuando la matriz de nitrocelulosa no se bloqueaba, para este estudio se utilizó skim milk como agente bloqueante, así mismo se utilizó en la almohadilla de muestra y del conjugado, dando mejores resultados en el formato final de la prueba LFA.

Otro factor importante en el desarrollo de la prueba LFA fue la selección del conjugado, si bien el oro coloidal (40 nm) ha sido históricamente la nanopartícula de elección para los ensayos de flujo lateral, el nanoshell de oro (150 nm) otro tipo de nanopartícula plasmónica, puede aumentar drásticamente la sensibilidad de los ensayos de flujo lateral porque cada partícula tiene un color 30 veces más intenso en comparación con el oro coloidal (NanoComposix, 2018), esto se confirma en nuestro estudio donde se observó una mejor detección de la prueba LFA con nanoshell de oro. Por otro lado, se ha visto que la sensibilidad de detección del LFA es menor que la de otros inmunoensayos basados en métodos fluorescentes, radiactivos y enzimáticos-colorimétricos (ELISA) (Rodríguez, 2016; Posthuma-Trumpie, et al., 2009), según nuestro estudio, en el que se evaluó estadísticamente la señal de detección de la prueba LFA basado en nanoshell de

oro, presento un diferencia significativa en una dilución menos del analito con respecto a la prueba de ELISA (dilución 1/16), sin embargo la prueba LFA presenta una banda visiblemente tenue en la dilución 1/16, lo que influiría en el rendimiento diagnóstico, que se discute más adelante, entonces se podría asumir que la prueba LFA basado en nanoshell de oro es comparable a la sensibilidad de detección de la prueba de ELISA esto se corrobora con otro estudio en el que una prueba en formato de red de papel bidimensional (2DPN) para el diagnóstico de malaria (Pf HRP2), al mejorar la señal de oro presento un límite de detección similar al informado para un ELISA (Fu, 2012).

Después de obtener la prueba LFA en su formato final para cada antígeno, se evaluó las características diagnosticas para cada uno con un panel de muestras de suero. La transferencia de ATSL al formato LFA tuvo una sensibilidad de 56.0% y una especificidad de 90.2%, aunque este último fue el mismo en la prueba de ELISA, la sensibilidad fue menor a lo esperado, considerando que se usó el mismo antígeno y panel de muestras de suero en ambas pruebas. Hasta el momento no se encontró reportes en la literatura, pruebas rápidas en el formato LFA que empleen antígenos totales para el serodiagnóstico de LC; sin embargo, se reportó el desarrollo de una prueba rápida que utiliza proteínas solubles totales de *Leishmania infantum*, para el diagnóstico de leishmaniasis visceral canina, la tira reactiva tuvo una sensibilidad del 99.2 % y una especificidad del 87.9 % (Schallig, et al., 2004). Esta prueba tuvo una sensibilidad muy alta en comparación a lo encontrado en el presente estudio y esto es debido al título de anticuerpos que generalmente presenta la LV frente a la LC, en cuanto a la especificidad nuestra prueba aparentemente fue mayor y esto podría deberse a la

concentración del antígeno total elegido, nuestro estudio utilizó 500 µg/mL frente al estudio de diagnóstico de leishmaniasis visceral canina que tiene 750 µg/mL, de acuerdo a nuestros resultados en el desarrollo de la prueba LFA en lo que respecta a la concentración, se observó que a mayor de 500 µg/mL presentaba reactividad con el control negativo e incluso el blanco (sin suero), lo que generaría falsos positivos que afectarían la especificidad de la prueba rápida. Considerando que nuestros resultados analizados por puntuación visual e intensidad, eran bajos frente al valor de sensibilidad encontrado en la prueba de ELISA, exceptuando la especificidad que fue el mismo, al comparar con lo obtenido en los distintos estudios en términos de sensibilidad fueron similares, donde los rangos reportados para el serodiagnóstico con antígenos crudos, son de 60% a 95% para sensibilidad y de 57.50% a 100% para especificidad (Cataldo, et al., 2010; Duarte, et al., 2015; Link, et al., 2017).

En los últimos años las pruebas serológicas rápidas en formato LFA para el diagnóstico de diferentes enfermedades infecciosas se han estado desarrollando a partir de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos, esto debido a las ventajas en términos de costo, reproducibilidad y mejora en el rendimiento diagnóstico. El análisis de la prueba diagnóstica en formato LFA que utiliza el oligopéptido opH2A y opLiP2a presentaron sensibilidades de 36.0% y 62.0 % y especificidades de 93.5% y 94.6% respectivamente, a pesar que no se reportaron estudios de pruebas rápidas que utilizan oligopéptidos para el serodiagnóstico de LC del nuevo mundo, se conoce de una prueba rápida comercial de diagnóstico directo (detección del parásito) para LC, sin embargo está limitado a la enfermedad causada por *Leishmania major* (Ben Salah, et al., 2014; Bennis, et al.,

2018) presente solo en el viejo mundo, en este último también se tiene una prueba rápida comercial para el serodiagnóstico de leishmaniasis visceral el cual está basado en una proteína recombinante K39 cuya sensibilidad y especificidad de la prueba se acercan al 95% (OPS, 2019).

Considerando que las características diagnosticas de las pruebas LFA que utilizan los oligopéptidos opH2A y opLiP2a, son comparables a su formato en ELISA, se encontró estudios que reportaron el uso de proteínas y/o péptidos de histonas y ribosomas para el serodiagnóstico de LC y LMC. Dentro de las histonas, se utilizaron las proteínas recombinantes: H2A, H2B, H3 y H4 para el diagnóstico de LC, reportando valores de sensibilidad de 51- 78% y especificidad de 55-67% (Souza, 2013); considerando que nuestro estudio empleó el péptido opH2A, este presentó una sensibilidad del 36% y una especificidad del 93.5% para un área endémica, sin embargo con un punto de corte menor al seleccionado ya sea en la prueba de ELISA o LFA, presenta un rendimiento diagnóstico similar a las histonas recombinantes lo que probablemente indicaría que el péptido utilizado podría ser el mejor determinante antigénico de la proteína H2A, sin embargo, si se opta por este punto de corte se esperaría un incremento de falsos positivos de las pruebas serológicas, lo que implica el riesgo de someter a un paciente al tratamiento contra leishmaniasis; así mismo en un estudio que utiliza la proteína recombinante H1 presento aparentemente un mejor perfil en el diagnóstico de LC (Sensibilidad = 67%; Especificidad = 91%) (Carmelo, 2002) frente a las otras histonas y al péptido opH2A en un área endémica, sin embargo en este mismo estudio se describió siete péptidos correspondientes a H1, los cuales presentaron valores de sensibilidad de 0-46% y especificidad de 91 – 100%, en el caso de

nuestro estudio cuando se evalúa el rendimiento diagnóstico de la prueba serológica que emplea opH2A en un área no endémica, se tiene un aumento de la sensibilidad para ELISA en un 72% y LFA en 50%, en cuanto a la especificidad en ambas pruebas es del 100%, este perfil de diagnóstico supera el rendimiento diagnóstico de los péptidos de H1 y es comparable a la H1 recombinante. En cuanto a las proteínas ribosomales se identificó péptidos derivados de las proteínas S25 y S5 de la subunidad ribosomal 40S, reportando que los péptidos eran altamente específicos (95-100%) para el diagnóstico de LC, pero presentaban una baja sensibilidad por debajo del 20%, este perfil de diagnóstico también fue similar en pacientes con LMC (Florez, 2017), en otro estudio en el que identificaron tres péptidos de la proteína ribosomal L25 para el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria, presentaron una sensibilidad menor al 40% y especificidad del 89% (González, 2002), a comparación de estos reportes previos, nuestro estudio basado en un péptido sintético proveniente de la proteína acida ribosomal P2a (opLiP2a), presento un mejor rendimiento para el diagnóstico de LC en un área endémica, en términos de sensibilidad (62%) y especificidad (94.6%), e inclusive fue mejor a la proteína acida ribosomal P2b recombinante que presento una sensibilidad de 50% y especificidad de 75% (Padilla, 2003).

Al comparar el desempeño de las pruebas en formato LFA y ELISA que utilizan opH2A, se tiene valores similares de sensibilidad y especificidad cuando es medido por puntuación visual e intensidad (PP%) y de acuerdo al análisis de Kappa, las dos pruebas presentan un acuerdo sustancial, lo mismo ocurre con la prueba LFA que utiliza opLiP2a que se exceptúa con la variación en la sensibilidad. Es de notar dentro de las pruebas LFA que el péptido opH2A

presenta una sensibilidad menor al ATSL, sin embargo, opLiP2a tiene un desempeño similar a ATSL, en general estos resultados fueron similares a los valores sensibilidad y especificidad obtenidos por ELISA en un previo estudio (Valdivia-Francia, 2018).

IX. CONCLUSIÓN

- Bajo las condiciones analizadas, se encontró que el antígeno total (ATSL) a una concentración de 0.5 mg/mL, en PBS pH 7.4, tiene una fijación optima en la membrana de nitrocelulosa (FF120HP), dando una señal alta y específica del inmunocomplejo formado.
- Se optimizaron las condiciones de reacción para la interacción de los oligopéptidos biotinilados con estreptavidina y su unión a una matriz FF120HP, con las concentraciones de oligopéptido 50 µg/mL y estreptavidina 200 µg/mL, en tampón Acetato 0.1M a pH 5.0, mostrando una clara discriminación entre la reacción visible con suero positivo para leishmaniasis y la ausencia de reactividad con suero negativo. La prueba LFA desarrollada brindo un resultado a los 40 minutos.
- La detección de la prueba LFA-opLiP2a fue mejorada con el conjugado Nanoshell de oro frente al oro coloidal, llegando a ser comparable al límite de detección de la prueba de ELISA basado en el mismo antígeno.
- El desempeño de la prueba rápida en formato LFA entre los oligopéptidos fue mejor para opLiP2a con una sensibilidad de 62.0% y especificidad de 94.6%, en comparación con opH2A que tiene una sensibilidad de 36.0% y especificidad de 93.5%, e incluso fue ligeramente mayor al obtenido con el antígeno total (ATSL) que tiene una sensibilidad de 56.0% y una especificidad de 90.2%.
- La transferencia de los antígenos (ATSL, opH2A y opLiP2a) al formato LFA presentaron un acuerdo sustancial consistente con la prueba de ELISA, que utiliza los mismos antígenos.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ejazi , S., & Ali, N. (2013). Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.*, 11(1), 79-98. doi:10.1586/eri.12.148
- Link, J., Alban, S., Soccol , C., Pereira, G., & Soccol, V. (2017). Synthetic Peptides as Potential Antigens for Cutaneous Leishmaniosis Diagnosis. *J Immunol Res*, 2017:5871043.
- Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., . . . Sereno, D. (2017). Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 57, 1-29. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>.
- Al-Salem, W., Ferreira, D., Dyer, N., Alyamani, E., Balghonaim, S., Al-Mehna, A., . . . Aldahan, M. (2014). Detection of high levels of anti- α -galactosyl antibodies in sera of patients with Old World cutaneous leishmaniasis: a possible tool for diagnosis and biomarker for cure in an elimination setting. *Parasitology*, 141(14), 1898-1903.
- Alsford, S., & Horn, D. (2004). Trypanosomatid histones. *Mol Microbiol*, 53(2), 365-372.
- Alvar, J., Velez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., & Jannin, J. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, 7(5), e35671. Obtenido de <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>
- Anfossi, L., Di Nardo, F., Profiti, M., Nogarol, C., Cavalera, S., Baggiani, C., . . . Rosati, S. A. (2018). A versatile and sensitive lateral flow immunoassay for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. *Anal Bioanal Chem*, 410(17), 4123-4134.
- Arevalo J, Deharo E, Privat-Maldonado A. (2015). Peptides and methods for the detection of leishmaniasis. World Intellectual Property Organization; WO2015001383 A1.
- Ashford, R. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, 30(12-13), 1269-1281.
- Bailey, M., & Lockwood, D. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*, 25(2), 203-211.
- Bangert, M., Flores-Chávez, M., Llanes-Acevedo, I., Arcones, C., Chicharro, C., García, E., . . . Cruz, I. (2018). Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis.*, 12(3), e0006277.

- Ben Salah, A., Z. A., Gharbi, A., Bettaieb, J., Ghawar, W., Khedher, A., & al, e. (2014). *Clinical evaluation of CL detect TM rapid test for cutaneous leishmaniasis: performance characteristics when compared to smear microscopy at multiple test sites*. New Orleans: ASTMH.
- Bennis, I., Verdonck, K., El Khalfaoui, N., Riyad, M., Fellah, H., Dujardin, J. C., . . . Boelaert, M. (2018). Accuracy of a Rapid Diagnostic Test Based on Antigen Detection for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Patients with Suggestive Skin Lesions in Morocco. *Am J Trop Med Hyg*, 99(3), 716-722. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6169188/>
- Benore, M., Ninfa, A., & Ballou, D. (2010). *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology* (Segunda ed.).
- Berlina, A., Taranova, N., Zherdev, A., Vengerov, Y., & Dzantiev, B. (2013). Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk. *Anal Bioanal Chem*, 405(14), 4997-5000.
- Bhowmick, S., & Ali, N. (2009). Identification of Novel Leishmania donovani Antigens that Help Define Correlates of Vaccine-Mediated Protection in Visceral Leishmaniasis. *PLoS One*, 4(6), e5820.
- Boelaert, M., El-Safi, S., Hailu, A., Mukhtar, M., Rijal, S., Sundar, S., . . . Peeling, R. (2008). Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 102(1), 32-40.
- Boggild, A., Miranda-Verastegui, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Adau, V., & Tulliano, G. (2007). Evaluation of a microculture method for isolation of Leishmania parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. *J Clin Microbiol*, 45(11), 3680–3684.
- Boggild, A., Ramos, A., Espinosa, D., Valencia, B., Veland, N., & Miranda-verastegui, C. (2010). Clinical and Demographic Stratification of Test Performance : A Pooled Analysis of Five Laboratory Diagnostic Methods for American Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.*, 83(2), 345–350.
- Boggild, A., Valencia, B., Espinosa, D., Veland, N., Ramos, A., & Arevalo, J. (2010). Detection and Species Identification of Leishmania DNA from Filter Paper Lesion Impressions for Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 50(1), 1-6.
- Burns, J., Shreffler, W., Benson, D., Ghalib, H., Badaro, R., & Reed, S. (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(2), 775-779.
- Carmelo, E. M. (2002). Antigenicity of Leishmania braziliensis histone H1 during cutaneous leishmaniasis: Localization of antigenic determinants. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9, 808-811.

- Cataldo, J., Mello, F., Mouta-Confort, E., Madeira, M., Schubach, A., & Genestra, M. (2010). Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Clin Lab Anal*, 24(5), 289-294.
- CDC. (2010). *Centers of Disease Control and Prevention*. USA.
- Celeste, B., Arroyo Sanchez, C., Ramos-Sanchez, M., Castro, L., Lima Costa, F., & Goto, H. (2014). Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 90(5), 860-865.
- Chan, L., Hannah, F., Joseph, K., Cavalli, G., Martins, H., & Neylon, C. (2007). Covalent Attachment of Proteins to Solid Supports and Surfaces via Sortase-Mediated Ligation. *PLoS one*, 2(11), e1164.
- Chavali, K., & Ramji, R. (2018). *Frugal Innovation in Bioengineering for the Detection of Infectious Diseases*. Springer International Publishing.
- Chivers, C., Koner, A., Lowe, E., & Howarth, M. (2011). How the biotin–streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer. *Biochem J*, 435(1), 55-63. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3062853/>
- Choi, C., & Lerner, E. (2001). Leishmaniasis as an emerging infection. *J. Investig Dermatol Symp Proc.*, 6(3), 175-182.
- Chun, P. (2009). Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. En R. Wong, & H. Tse (Edits.), *Lateral Flow Immunoassay* (págs. 75-94). New York: Humana Press.
- Costa, M., Penido, M., dos Santos, M., Doro, D., de Freitas, E., Michalick, M., . . . Fernandes, A. (2012). Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(5), e1622.
- Crowther, J. (2001). *Validation of Diagnostic Tests for Infectious Diseases*. In: *The Elisa Guidebook* (Vol. 149). Humana Press. Obtenido de <https://doi.org/10.1385/1-59259-049-7:301>
- de Assis, T., Braga, A., Pedras, M., Oliveira, E., Barral, A., Siqueira, I., . . . Rabello, A. (2011). Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 105(2), 81-85.
- De Castro, R., De Souza, A., Paviones, N., De Moraes, J., Ribeiro, I., Agripino, J., . . . Fietto, J. (2022). Urea, salts, and Tween 20 influence on adsorption of IgG and *Leishmania* rNTPDase2 to nitrocellulose. *Analytical Biochemistry*, 646, 114648.

- de Paiva-Cavalcanti, M., de Moraes, R., Pessoa-E-Silva, R., Trajano-Silva, L., Gonçalves-de-Albuquerque, S., & Tavares, D. (2015). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Bioscience*, 5, 31.
- de Vries, H., Reedijk, S., & Schallig, H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol*, 99-109.
- Duarte, M., Pimenta, D., Menezes-Souza, D., Magalhães, R., Diniz, J., & Costa, L. (2015). Proteins selected in *Leishmania (Viannia) braziliensis* by an immunoproteomic approach with potential serodiagnosis applications for tegumentary leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*, 22(11), 1187-1196.
- Ejazi, S. A. (2019). A multicentric evaluation of dipstick test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in India, Nepal, Sri Lanka, Brazil, Ethiopia and Spain. *Sci Rep*, 9(1), 9932.
- Ejazi, S., Bhattacharya, P., Bakhteyar, M., Mumtaz, A., Pandey, K., Das, V., . . . Ali, N. (2016). Noninvasive Diagnosis of Visceral Leishmaniasis: Development and Evaluation of Two Urine-Based Immunoassays for Detection of *Leishmania donovani* Infection in India. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(10), e0005035. doi:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5065134/>
- Ejazi, S., Bhattacharyya, A., Choudhury, S., Ghosh, S., Sabur, A., Pandey, K., . . . Ali, N. (2018). Immunoproteomic Identification and Characterization of *Leishmania* Membrane Proteins as Non-Invasive Diagnostic Candidates for Clinical Visceral Leishmaniasis. *Sci Rep*, 8, 12110. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6092337/>
- Ejazi, S., Ghosh, S., Bhattacharyya, A., Kamran, M., Das, S., Bhowmick, S., . . . Ali, N. (2020). Investigation of the antigenicity and protective efficacy of *Leishmania* promastigote membrane antigens in search of potential diagnostic and vaccine candidates against visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors.*, 13, 272. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7260476/>
- Elmahallawy, E., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J., & Gutierrez Fernandez, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries*, 8(8), 961–972. doi:10.3855/jidc.4310
- Fargeas, C., Hommel, M., Maingon, R., Dourado, C., Monsigny, M., & Mayer, R. (1996). Synthetic peptide based enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol*, 34(2), 241-248.
- Faria, A., Costa, M., Giusta, M., Grimaldi, G., Penido, M., Gazzinelli, R., & Andrade, H. (2011). Andrade HM. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(9), e1310.

- Florez, M. d. (2017). Synthetic Peptides Derived from Ribosomal Proteins of *Leishmania* spp. in Mucocutaneous Leishmaniasis: Diagnostic Usefulness. *Protein Pept Lett*, 10(24), 982-988.
- Fraga, D. B. (2016). The Rapid Test Based on *Leishmania infantum* Chimeric rK28 Protein Improves the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis by Reducing the Detection of False-Positive Dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* , 10(1), e0004333.
- Freire, M., Rêgo, F., Cota, G., Pascoal-Xavier, M., & Oliveira, E. (2021). Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. *PLoS ONE*, 16(5), e0251956.
- Fridley, G. H. (2013). The evolution of nitrocellulose as a material for bioassays. *MRS Bulletin*, 38, 326-330. Obtenido de <https://doi.org/10.1557/mrs.2013.60>
- Fu, E. L.-M. (2012). Two-dimensional paper network format that enables simple multistep assays for use in low-resource settings in the context of malaria antigen detection. *Anal Chem*, 84(10), 4574-9.
- Galanti, N., Galindo, N., Sabaj, V., Espinoza, I., & Toro, G. (1998). Histone genes in Trypanosomatids. *Parasitol Today.*, 14(2), 64–70.
- Garcia, V., Guerrero, S., Gugliotta, L., & Gonzalez, V. (2020). A lateral flow immunoassay based on colored latex particles for detection of canine visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, 212, 105643.
- Gomes, C., Oliveira de Moraes, O., Roselino, A., Aparecida de Paula, N., Ataíde Soares, K., & Ribeiro Sampaio, R. (2014). Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol*, 89(5), 701–709.
- Gonzales-Moa, M., Dorst, B., Lagatie, O., Verheyen, A., Stuyver, L., & Biamonte, M. (2018). Proof-of-Concept Rapid Diagnostic Test for Onchocerciasis: Exploring Peptide Biomarkers and the Use of Gold Nanoshells as Reporter Nanoparticles. *ACS Infect Dis*, 4(6), 912-917.
- González, A. M. (2002). Analysis of NLS and rRNA binding motifs in the L25 ribosomal protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* : investigation of its diagnostic capabilities. *Parasitology*, 125, 51–57.
- Goto, H., & Lindoso, J. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 8, 419–433.
- Hide, M., Bucheton, B., Kamhawi, S., Bras-Gonçalves, R., Sundar, S., Lemesre, J., & Bauls, A. (2006). Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. En M. Tibayrenc (Ed.), *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies* (págs. 87-123).
- Holstein, C., Chevalier, A., Bennett, S., Anderson, A., Keniston, K., Olsen, C., . . . Yager, P. (2016). Immobilizing affinity proteins to nitrocellulose: a toolbox for paper-based assay developers. *Anal Bioanal Chem*, 408(5), 1335-1346.

- Humbert, M., Costa, L., Katis, I., Ramos, F., Machado, A., Sones, C., . . . Christodoulides, M. (2019). A rapid diagnostic test for human Visceral Leishmaniasis using novel Leishmania antigens in a Laser Direct-Write Lateral Flow Device. *Emerg Microbes Infect.*, 8(1), 1178–1185.
- Jones, K. (2009). Lateral Flow Immunoassay. En R. Wong, & H. Tse (Edits.), *FUSION 5: A New Platform For Lateral Flow Immunoassay Test* (págs. 115-130). New York: Humana Press.
- Juntunen, E., Myyryläinen, T., Salminen, T., Soukka, T., & Pettersson, K. (2012). Performance of fluorescent europium(III) nanoparticles and colloidal gold reporters in lateral flow bioaffinity assay. *Anal Biochem*, 428(1), 31-38.
- Kim, H., Chung, D., & Kang, M. (2019). A new point-of-care test for the diagnosis of infectious diseases based on multiplex lateral flow immunoassays. *Analyst*, 144, 2460-2466. Obtenido de <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/an/c8an02295j#!divAbstract>
- Koczula, K., & Gallotta, A. (2016). Lateral flow assays. *Essays Biochem*, 60(1), 111-120. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986465/>
- Kulabhusan, P., Rajwade, J., Hammeed, A., & Paknikar, K. (2017). Lateral flow assay for rapid detection of white spot syndrome virus (WSSV) using a phage-displayed peptide as bio-recognition probe. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(11), 4459-4469.
- Lamm, R., Alves, C., Perrotta, G., Murphy, M., Messina, C., & Sanchez, J. (2018). Prevalence of and factors associated with negative microscopic diagnosis of cutaneous leishmaniasis in rural Peru. *Am J Trop Med Hyg*, 99(2), 331-337. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6090363/>
- Liljas, A. (1982). Structural studies of ribosomes. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 40, 161-228. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(82\)90013-X](https://doi.org/10.1016/0079-6107(82)90013-X).
- Lopez, M., Orrego, C., Cangalaya, M., Inga, R., & Arevalo, J. (1993). Diagnosis of Leishmania via the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*, 49(3), 348-356.
- Luger, K., Mäder, A., Richmond, R., Sargent, D., & Richmond, T. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*(389), 251-260.
- Maia, Z., Lírio, M., Mistro, S., Mendes, C., Mehta, S., & Badaro, R. (2012). Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS Negl Trop Dis.*, 6(1), e1484.
- Manetti-Skraba, C., Bocchi-Pedroso, R., Fiorini, A., Rosado, F., Alessi-Aristides, S., Campana-Lonardonid, M., . . . Verzignassi-Silveira, T. (2014). Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of Leishmania (Viannia) braziliensis. *Diagnostic Microbiology and*

- Infectious Disease*, 78(4), 411-417. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889313004665>
- Mehregan, D. (1999). Histologic Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol.*, 17, 297-304.
- Menezes-Souza , D., de Oliveira Mendes, T., de Souza Gomes , M., Bartholomeu, D., & Fujiwara , R. (2015). Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin l-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(1), e3426.
- Menezes-Souza, D., Oliveira, A., Gomes, D., & Reis-cunha, J. (2014). Mapping of the HSP83.1 Protein of *Leishmania braziliensis* Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol*, 21(7), 949-959.
- Metkar, S., Mahajan, S., & Sainis, J. (1995). Modified procedure for nonspecific protein staining on nitrocellulose paper using Coomassie brilliant blue R-250. *Anal Biochem*, 227(2), 389-391.
- MINSA. (2022). *Boletín Epidemiológico del Perú SE 12-2022*. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades, Lima-Perú. Obtenido de https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_202212_22_181950_2.pdf
- Mitropoulos, P., Konidas, P., & Durkin-Konidas, M. (2010). New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *Am Acad Dermatol. Elsevier Inc*, 63(2), 309-322.
- Muller, S., Plaue, S., Couppez, M., & Van Regenmortel, M. (1986). Comparison of different methods for localizing antigenic regions in histone H2A. *Mol Immunol*, 23(6), 593-601.
- NanoComposix. (2018). Lateral Flow Assay Development Guide. En *Lateral Flow Handbook v.1.4* (págs. 1-39). Obtenido de https://www.lubio.ch/assets/PDFs/nanoComposix-Handbook-Lateral_Flow_Assay_Development_Guide.pdf
- O'Farrell, B. (2009). Evolution in Lateral Flow–Based Immunoassay Systems. En R. Wong, & H. Tse (Edits.), *Lateral Flow Immunoassay* (págs. 1-34). New York: Humana Press.
- OMS. (2018). *Organización Mundial de la Salud: Leishmaniasis*. Obtenido de Organización Mundial de la <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- OPS. (2019). *Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas*. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud. Obtenido de

https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/50524/9789275320631_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Padilla, R. C. (2003). Characterization and immunoreactivity of *Leishmania braziliensis* P2 β acidic ribosomal protein. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 20, 92-96.
- Pomares, C., Despierres, L., Giudice, P., Delaunay, P., Michel, G., Ferrua, B., & Marty, P. (2012). Western blot analysis as an aid for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 106(7), 452-454.
- Posthuma-Trumpie, G., Korf, J., & van Amerongen, A. (2009). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*, 303(2), 569-582.
- Přistoupil, T., Kramlová, M., & Stěrbíková, J. (1969). On the mechanism of adsorption of proteins to nitrocellulose in membrane chromatography. *J Chromatogr A*, 42(3), 367-375.
- Reimão, J. Q. (2020). Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods. *Microorganisms*, 8(11), 1632. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7690623/>
- Reis, L., Brito, M., Almeida, E., Félix, S., Medeiros, A., Silva, C., & Pereira, V. (2008). Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*, 41(5), 439-443.
- Reithinger, R, JC, D., H, L., C, P., B, A., & S., B. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7(9), 581-596.
- Requena, J., Alonso, C., & Soto, M. (2000). Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. *Parasitol Today*, 16(6), 245-250.
- Rodríguez, M. C.-L. (2016). Silver and gold enhancement methods for lateral flow immunoassays. *Talanta*, 148, 272-8.
- Rubin, R., Joslin, F., & Tan, E. (1982). Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*, 25(7), 779-782.
- Saha, S., Goswami, R., Pramanik, N., Guha, S., Saha, B., Rahman, M., . . . Ali, N. (2011). Easy Test for Visceral Leishmaniasis and Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis. *Emerg Infect Dis.*, 17(7), 1304-1306.
- Sajid, M., Kawde, A., & Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(6), 689-705. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S131961031400129X>

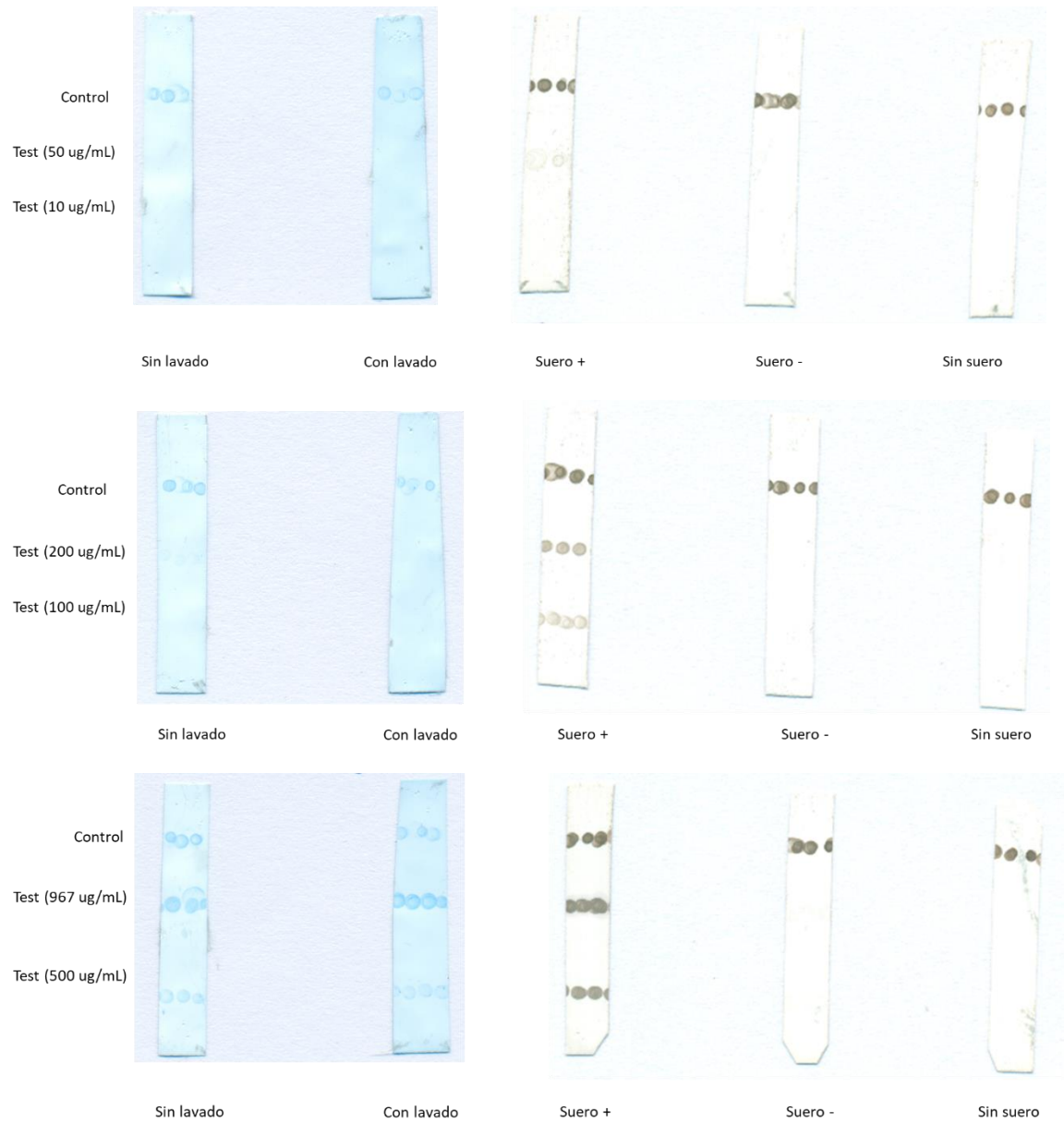
- Salman, S., Rubeiz, N., & Kibbi, A. (1999). Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical. Clin Dermatol.*, 17(99), 2291-296.
- Samir Cubas, W., Centeno-Leguía, D., Arteaga-Livias, K., & Depaz-López, E. (2019). Revisión clínica y epidemiológica de la leishmaniasis tegumentaria en una región central del Perú. *Revista chilena de infectología*, 36(6), 707-715.
doi:<https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182019000600707>
- Sánchez-Saldaña, D., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Carpio, R., Garcés-Velasco, N., & Regis-Roggero, A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*, 14(2), 82-98.
- Savioli, L., & Daumerie, D. (2010). *First WHO report on neglected tropical diseases: Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases*. Ginebra: WHO.
- Schallig, H., Cardoso, L., Hommers, M., Kroon, N., Belling, G., Rodrigues, M., . . . Vetter, H. (2004). Development of a Dipstick Assay for Detection of Leishmania-Specific Canine Antibodies. *J Clin Microbiol*, 42(1), 193-197. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321708/>
- Sharma, S., Zapatero-Rodriguez, J., Estrela, P., & O’Kennedy, R. (2015). Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics. *Biosensors*, 5(3), 577-601. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4600173/>
- Silvestre, R., Santarém, N., Teixeira, L., Cunha, J., Schallig, H., & Cordeiro da Silva, A. (2009). Evaluation of Leishmania species reactivity in human serologic diagnosis of leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 81(2), 202-208. Obtenido de <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/81/2/article-p202.xml>
- Singh, M., Jamal, F., Dubey, A., Shivam, P., Kumari, S., Bordoloi, C., . . . Singh, S. (2019). Visceral leishmaniasis: A novel nuclear envelope protein 'nucleoporins-93 (NUP-93)' from Leishmania donovani prompts macrophage signaling for T-cell activation towards host protective immune response. *Cytokine*, 113, 200-215.
- Skeiky, Y., Benson, D., Elwasila, M., Badaro, R., Burns, J., & Reed, S. (1994). Antigens shared by Leishmania species and Trypanosoma cruzi: Immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infect Immun*, 62(5), 1643-1651.
- Soto, M., Quijada, L., Larreta, R., Iborra, S., Alonso, C., & Requena, J. (2003). Leishmania infantum possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression. *Leishmania infantum possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression*, 127(2), 95-105.
- Soto, M., Requena, J., Quijada, L., & Alonso, C. (1996). Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant Leishmania P2 acidic ribosomal proteins. *Clin Diagn Lab Immunol*, 3(4), 387-391.

- Soto, M., Requena, J., Quijada, L., Angel, S., Gomez, L., & Guzman, F. (1995). During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin Exp Immunol*, 100(2), 246-252.
- Soto, M., Requena, J., Quijada, L., Garcia, M., Guzman, F., Patarroyo, M., & Alonso, C. (1995). Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett*, 48(3), 209-214.
- Souza, A. S. (2013). Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. *PLoS One*, 6(8), e66110. doi: 10.1371/journal.pone.0066110
- Srivastava, P., Gidwani, K., Picado, A., Van der Auwera, G., Tiwary, P., & Ostyn, B. (2013). Molecular and serological markers of *Leishmania donovani* infection in healthy individuals from endemic areas Bihar, India. *Trop Med Int Health*, 18(5), 548-554.
- Sullivan, W., Naguleswaran, A., & Angel, S. (2006). Histones and histone modifications in protozoan parasites. *Cell Microbiol*, 8(12), 1850-1861.
- Sundar, S., Reed, S., Singh, V., Kumar, P., & Murray, H. (1998). Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*, 351(9102), 563-565.
- Szargiki, R., Castro, E., Luz, E., Kowalthuk, W., Machado, A., & Thomaz-Soccol, V. (2009). Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis*, 13(1), 47-52.
- Tchórzewski, M. (2002). The acidic ribosomal P proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 34(8), 911-915.
- Tejada, A., Tejada, O., & Zorrilla, V. (2001). Leishmaniasis tegumentaria en Ambo, Huánuco. *Rev Per Med Trop UNMSM*, 1(21-8), 1. Obtenido de http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/SPEIT/2001_n1/Articulo_Original/pag_22-25.htm.
- Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. *J Parasit Dis*, 44(2), 253-272. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7223249/>
- Valdivia-Francia, M. (2018). *VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE ELISA INDIRECTO CON LOS PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS opH2A y opLiP2a PARA EL SERODIAGNÓSTICO DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA*. Tesis de Maestría, UPCH, Lima.
- Vega-Lopez, F. (2003). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Cur Opin Infec Dis*, 16, 97-101.

- Vink, M., Nahzat, S., Rahimi, H., Buhler, C., Ahmadi, B., Nader, M., . . . Cruz, I. (2018). Evaluation of point-of-care tests for cutaneous leishmaniasis diagnosis in Kabul, Afghanistan. *EBioMedicine*, 37, 453-460.
- Xu, Q., Xu, H., Gu, H., Li, J., Wang, Y., & Wei, M. (2009). Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I. *Materials Science and Engineering: C*, 29(3), 702-707.
- Yonekita, T., Ohtsuki, R., Hojo, E., Morishita, N., Matsumoto, T., Aizawa, T., & Morimatsu, F. (2013). Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 93(3), 251-256.
- Yoneyama, K., Daiane de Peder, L., Lonardoni, M., & Silveira, T. (2007). Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Paraná State, Brazil. *Braz J Infect Dis*, 11(3), 360-364.
- Zijlstra, E. E.-H. (2001). Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 6(2), 108–113. Obtenido de <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00680>.

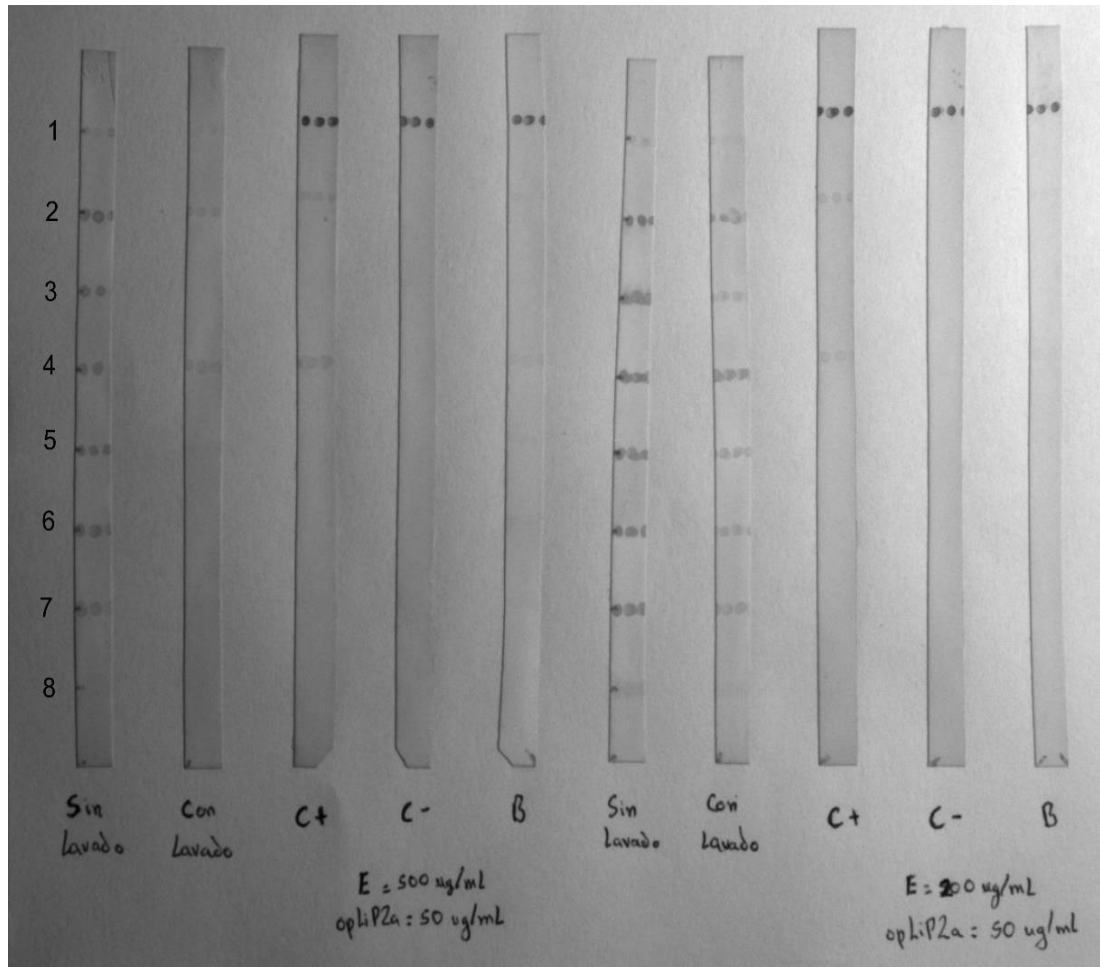
ANEXO

- **Establecimiento de las condiciones óptimas de fijación del Antígeno Total Soluble de Leishmania “ATSL” en nitrocelulosa.**



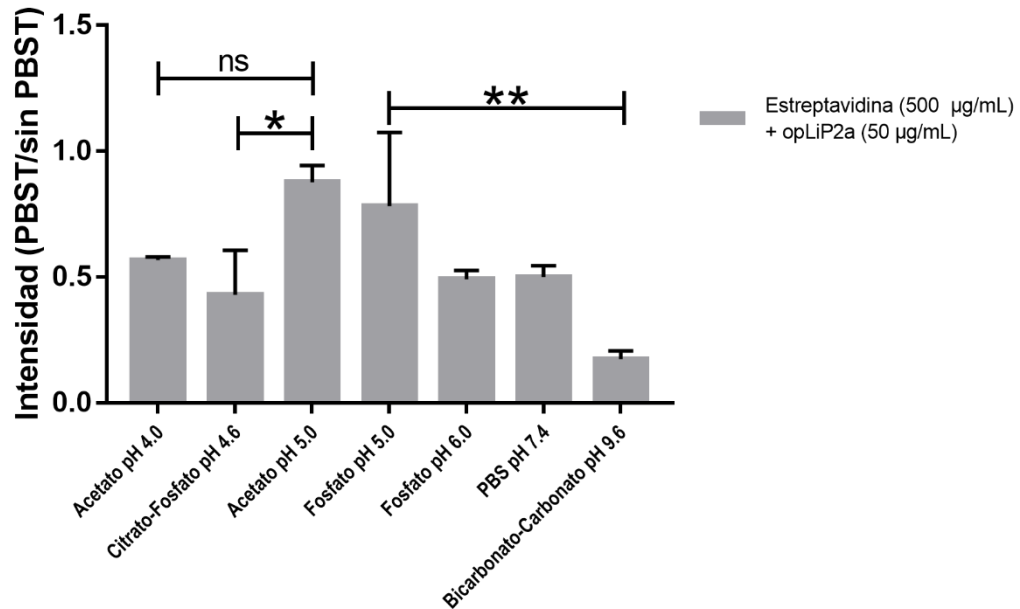
- La inmovilización del péptido opLiP2a en nitrocelulosa a través del enlace estreptavidina-biotina

A. Buffer de fijación de Estreptavidina -opLiP2a

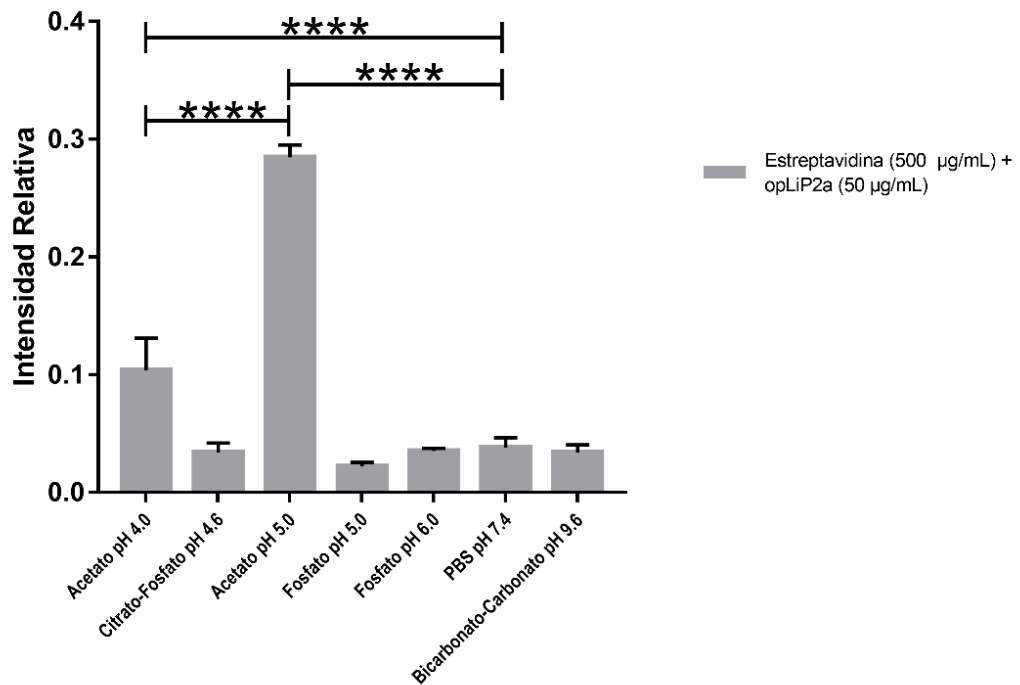


1-Control IgG anticabra, del 2- 8 fijación de Estreptavidina -opLiP2a a diferentes condiciones de pH: 2-Buffer Acetato pH 4.0, 3-Buffer Citrato-Fosfato pH 5.0, 4-Buffer Acetato pH 5.0, 5-Buffer Fosfato pH5.0, 6-Buffer Fosfato pH 6.0, 7-PBS pH7.4, 8-Buffer Bicarbonato-Carbonato pH9.6

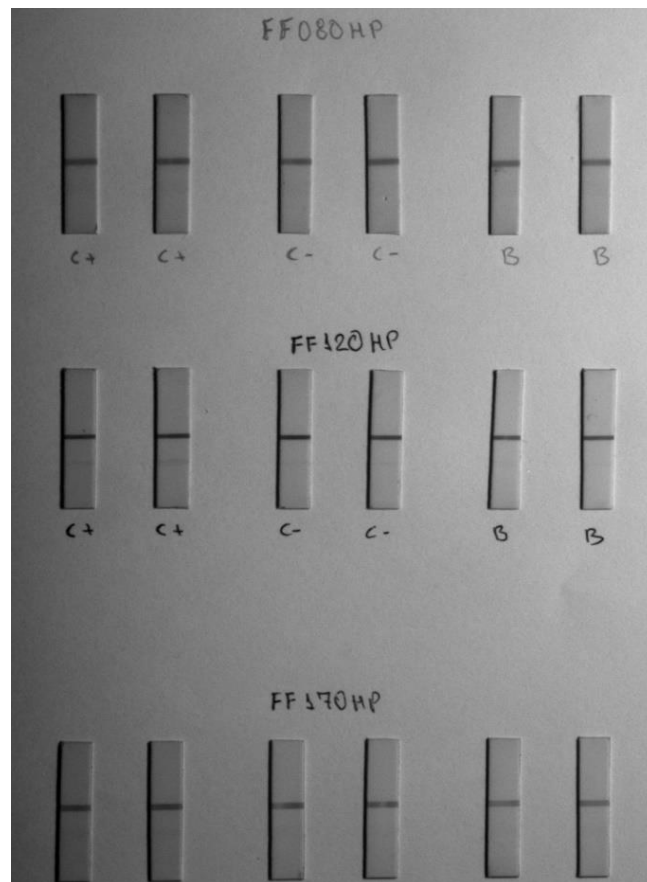
1 Prueba de eficiencia de inmovilización de opLiP2a-estreptavidina (500 µg/mL) a diferentes condiciones de pH.



2 Ensayo de Dot Blot del sistema opLiP2a-estreptavidina (500 µg/mL) a diferentes condiciones de pH.

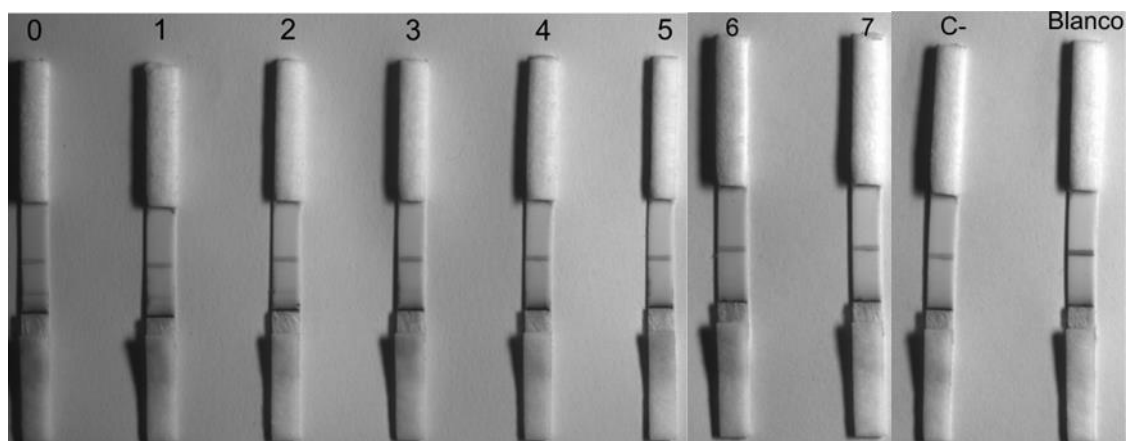


3 Ensayo de Dot blot del sistema opLiP2a-estreptavidina en diferentes tipos de matrices de nitrocelulosa (FF080, FF120, FF170)

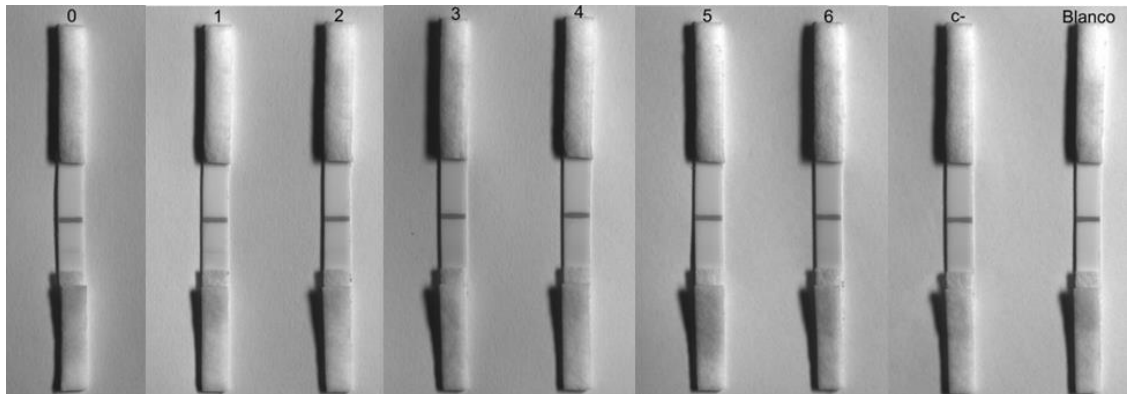


- Selección del conjugado - Limite de detección

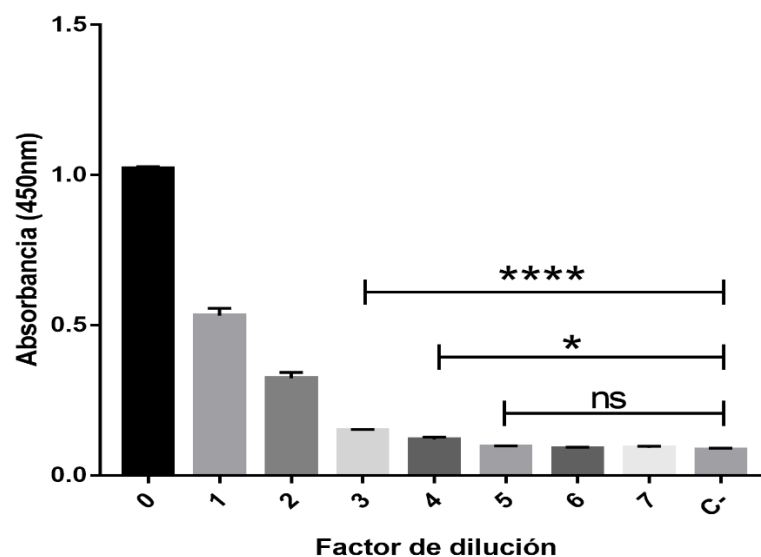
A. Prueba de LFA - Nanoshell de oro



B. Prueba de LFA – Oro coloidal

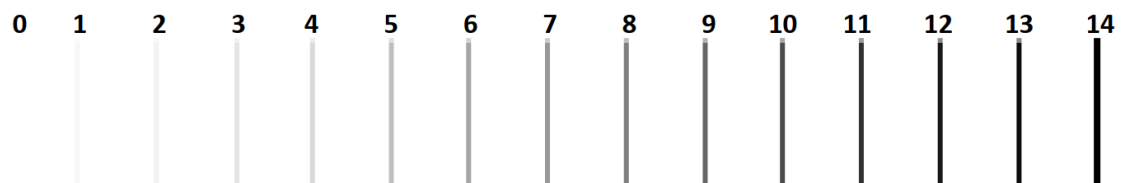


C. Límite de detección de la prueba de ELISA a través de la titulación de suero positivo.

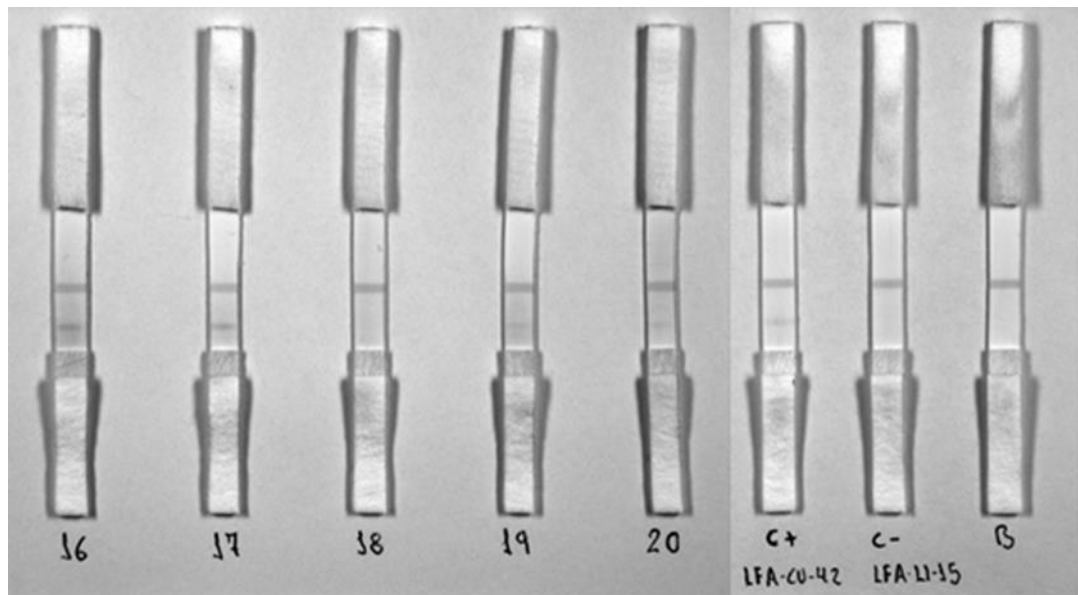


• Serodiagnóstico de la prueba rápida en formato LFA

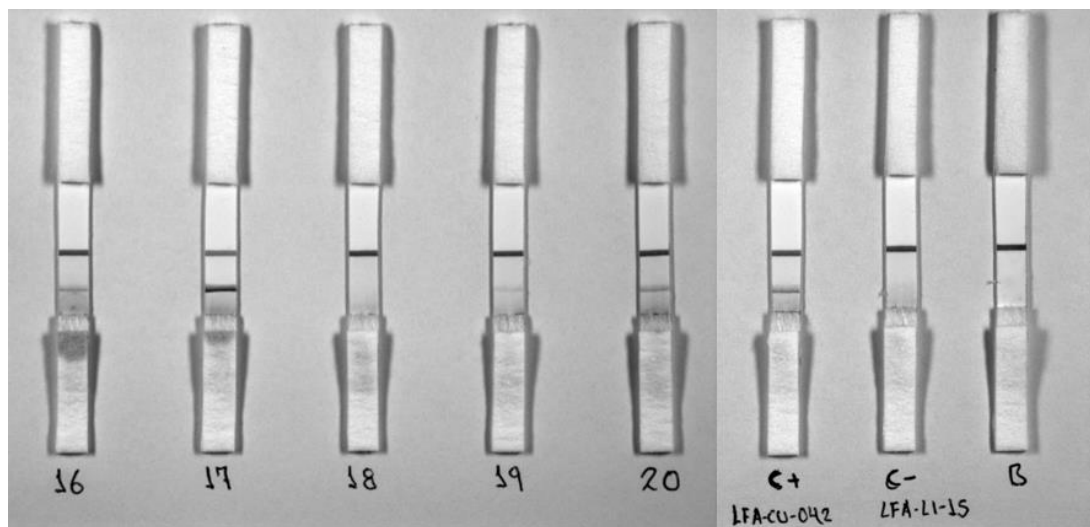
A. Tarjeta de puntuación visual (Gonzales-Moa, et al., 2018)



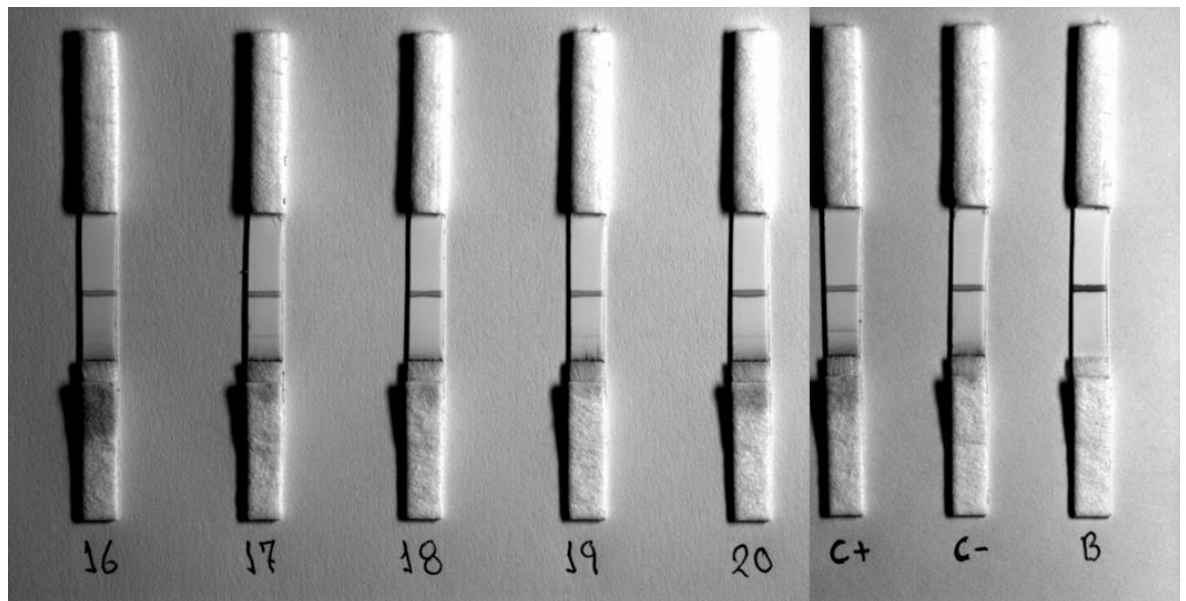
- B. Serodiagnóstico de la prueba LFA con ATSL, detectado con oro coloidal. Ejemplos representativos de muestras positivas para leishmaniasis, números 16,17,19 y 20.**



- C. Serodiagnóstico de la prueba LFA con opH2A, detectado con Nanoshell de oro. Ejemplos representativos de muestras positivas para leishmaniasis, números 16,17,19 y 20.**



D. Serodiagnóstico de la prueba LFA con opLiP2a, detectado con Nanoshell de oro. Ejemplos representativos de muestras positivas para leishmaniasis, números 16,17,19 y 20.



• **Comparación entre opH2A y opLiP2a (Kappa de Cohen)**

Antígeno	opLiP2a								
	LFA	Muestras		Negativo	Positivo	Acuerdo observado %	Acuerdo esperado %	Kappa	Error Estándar
opH2A	Puntuación visual	Leishmaniasis-PCR (n=50)	Negativo	15	17				
			Positivo	4	14	58	46.64	0.2129	0.1235
		Individuos sanos (n=114)	Negativo	106	2				
			Positivo	3	3	95.61	90.81	0.5226	0.0932
		Total (n=164)	Negativo	121	19				
			Positivo	7	17	84.15	69.84	0.47	0.0758
	Intensidad Relativa	Leishmaniasis-PCR (n=50)	Negativo	12	15				
			Positivo	5	18	60	48.72	0.22	0.1302
		Individuos sanos (n=114)	Negativo	106	4				
			Positivo	2	2	94.74	91.6	0.3736	0.0916
		Total (n=164)	Negativo	118	19				
			Positivo	7	20	84.15	67.59	0.5109	0.0761
	PP%)	Leishmaniasis-PCR (n=50)	Negativo	17	14				
			Positivo	8	11	56	50	0.12	0.1373
		Individuos sanos (n=114)	Negativo	108	3				
			Positivo	1	2	96.49	93.21	0.483	0.0905
		Total (n=164)	Negativo	125	17				
			Positivo	9	13	84.15	73.2	0.4084	0.0768