



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN
ANALÍTICA DE UNA TÉCNICA DE
ELISA INDIRECTO BASADA EN UNA
PROTEÍNA MULTIEPITÓPICA
RECOMBINANTE PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSIS
CUTÁNEA

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

GERSON CÓRDOVA SERRANO

LIMA – PERÚ

2017

ASESORA

Vanessa Karina Adui Sicheri, MSc, PhD

DEDICATORIA

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis, Dra. Vanessa Adauí Sichei.

Por su enorme apoyo durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mi jurado de tesis, Dra. Patricia Herrera Velit, M.Sc. Teresa Barreto

Gaviria y Dra. Katherine Torres Fajardo.

Por sus detalladas reflexiones que enriquecieron el presente manuscrito de tesis.

Al Dr. Mirko Zimic Peralta y el Laboratorio de Bioinformática y Biología

Molecular.

Por su apoyo en la predicción inmunoinformática de los epítopes conformantes de
la proteína multiepitópica.

Al Dr. Jorge Arévalo Zelada y el Laboratorio de Patho-Antígenos.

Por acogerme en su laboratorio durante el desarrollo del presente trabajo de
investigación.

A la Dra. Manuela Verástegui Pimentel y el Laboratorio de Investigación en

Enfermedades Infecciosas.

Por su cordial disposición al proveer muestras de suero de pacientes chagásicos

A la Dra. María Cruz Saldarriaga.

Por su obsequioso suministro de la colección de muestras de plasma de pacientes
con diagnóstico confirmado para leishmaniosis cutánea en la región de Cusco

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica.

Por la beca otorgada para cursar el programa de Maestría en Bioquímica y Biología Molecular en UPCH (CONCYTEC/contrato 014-2013-FONDECYT).

**A la Cooperación Belga para el Desarrollo (DGD/FA3-III programa
2014-2016).**

Por el co-financiamiento del presente trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCION	1
I. GENERALIDADES	
1.1. Planteamiento de la investigación	3
1.2. Planteamiento del problema	7
1.3. Marco teórico	
1.3.1. Leishmaniosis	8
1.3.2. Epidemiología de leishmaniosis cutánea	9
1.3.2.1. Epidemiología de leishmaniosis cutánea americana en el Perú	11
1.3.3. Métodos de diagnóstico de leishmaniosis cutánea americana	15
1.3.3.1. Métodos de diagnóstico serológico de Leishmaniosis cutánea americana	15
1.3.4. Relevancia de las técnicas serológicas y de los antígenos mimotópicos en el diagnóstico de Leishmaniosis cutánea americana	20
1.3.5. Proteína multiepitópica “M2N”	22
1.4. Justificación del estudio	27
1.5. Hipótesis	29
1.6. Objetivos	29
II. METODOLOGÍA	
2.1. Materiales	
2.1.1. Reactivos	31
2.1.2. Materiales de plástico	31

2.1.3. Equipos de Laboratorio	32
2.2. Métodos	
2.2.1. Diseño del estudio	33
2.2.2. Lugar de estudio	33
2.2.3. Población de estudio	33
2.2.4. Muestras de suero/plasma	35
2.2.4.1. Colección de muestras de suero negativo	36
2.2.5. Procedimientos y técnicas	
2.2.5.1. Producción de la proteína multiepitópica	37
2.2.5.2. Purificación de la proteína multiepitópica	38
2.2.5.2.1. Cromatografía de afinidad	38
2.2.5.2.2. Diálisis de la proteína multiepitópica	39
2.2.5.2.3. Escisión de la cola 6*His de la proteína multiepitópica	39
2.2.5.3. Optimización de un test de ELISA indirecto basado en la proteína M2N	40
2.2.5.3.1. Optimización con el protocolo de ELISA N°01	43
2.2.5.3.2. Optimización con el protocolo de ELISA N°02	44
2.2.5.4. Validación analítica de un test de ELISA indirecto basado en la proteína M2N	46
2.2.5.4.1. Umbral positivo/negativo y Sensibilidad/Especificidad diagnóstica primaria	46
2.2.5.4.2. Especificidad analítica	48
2.2.5.4.3. Capacidad predictiva diagnóstica	49
2.2.5.4.4. Precisión analítica	50

2.2.6. Análisis estadístico	51
III. RESULTADOS	
3.1. Producción y purificación de la proteína M2N	57
3.2. Optimización del test de ELISA indirecto basado en la proteína recombinante M2N	58
3.3. Validación analítica del test M2N–ELISA	69
3.3.1. Umbral positivo/negativo y Sensibilidad/Especificidad diagnóstica primarias	72
3.3.2. Especificidad analítica	75
3.3.3. Capacidad predictiva diagnóstica del test de ELISA basado en la proteína M2N	82
3.3.4. Precisión analítica	
3.3.4.1. Precisión Intra-placa	88
3.3.4.2. Precisión Inter-placas	89
3.3.4.3. Precisión Inter-diario	91
3.3.4.4. Control del proceso analítico del test M2N–ELISA	93
IV. DISCUSIÓN	95
V. CONCLUSIONES	104
VI. RECOMENDACIONES	105
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

FIGURAS

Figura N°01. Estatus endémico mundial de Leishmaniosis cutánea para el año 2013 _____	10
Figura N° 02: Mapa de la Tasa de Incidencia Acumulada de leishmaniosis cutánea americana por distritos, Perú, 2016* _____	11
Figura N° 03: Número de casos confirmados por año de leishmaniosis cutánea americana y leishmaniosis mucocutánea en Perú _____	12
Figura N° 04: Tendencia e incidencia acumulada de la leishmaniosis cutánea americana en Perú _____	13
Figura N° 05: Tasa de incidencia acumulada de leishmaniosis cutánea americana por departamentos del Perú _____	13
Figura N° 06. Mapa del vector de expresión <i>pET28a (+)</i> con secuencia codificante para <i>M2N</i> insertada _____	27
Figura N° 07. DO de la muestra positiva frente a la DO de la muestra negativa _____	62
Figura N° 08. Unión inespecífica de anticuerpos de muestras de suero/plasma frente al incremento del porcentaje de SM del buffer de bloqueo MPBS _____	63
Figura N° 09. Absorbancia relativa de diluciones seriadas de la muestra positiva Rap42 frente a diluciones seriadas del antígeno M2N _____	65
Figura N° 10. Absorbancia relativa de diluciones seriadas de la muestra negativa CN/LC-01 frente a diluciones seriadas del antígeno M2N _____	66

Figura N° 11: Diluciones seriadas de las muestras positiva (Rap42) y negativa (CN/LC-01) frente a dos tipos de antígeno M2N; ASTL	68
Figura N° 12. Absorbancia relativa de las muestras “positivas” analizadas empleando los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA	70
Figura N° 13. Absorbancia relativa de las muestras “negativas” analizadas empleando los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA	71
Figura N° 14. Dispersión de las absorbancias relativas de las muestras identificadas como positivos y distinguidos como negativos empleando el test M2N–ELISA	73
Figura N° 15. Dispersión de las absorbancias relativas de muestras identificadas como positivos y distinguidos como negativos empleando el test ASTL–ELISA	74
Figura N° 16. Absorbancia relativa de los sueros de pacientes chagásicos analizados empleando el test M2N–ELISA	77
Figura N° 17. Absorbancia relativa de los sueros de pacientes chagásicos analizados empleando el test ASTL–ELISA	78
Figura N° 18. Absorbancia relativa de los sueros de pacientes chagásicos analizados empleando los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA	79
Figura N° 19. Resultados del descarte de anticuerpos IgG contra <i>T.cruzi</i> mediante la técnica TESA-Blot	81
Figura N° 20. Curvas ROC de los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA	85
Figura N° 21. Curva ROC del test M2N/ASTL–ELISA	87
Figura N° 22. Precisión Intra-placa del test M2N–ELISA	88
Figura N° 23. Precisión Inter-placas del test M2N–ELISA	90

Figura N° 24: Precisión Inter-diario (heterogéneo) del test M2N–ELISA _____ 92

Figura N° 25: Precisión Inter-diario (homogéneo) del test M2N–ELISA _____ 93

TABLAS

Tabla N° 01. Tasa de incidencia acumulada de leishmaniosis cutánea americana por etapas de vida en Perú _____	14
Tabla N° 02. Test de ELISA indirecto basados en diferentes tipos de antígenos desarrollados desde 1980 hasta 2015 para serodiagnóstico de LC _____	18-19
Tabla N° 03. Alelos de MHC clase II seleccionados para la predicción de epítopes lineales para linfocitos T y B _____	25
Tabla N° 04. Epítopes seleccionados para el diseño de la proteína multiepitópica _____	25
Tabla N° 05. Purificación de la proteína multiepitópica M2N _____	57
Tabla N° 06: Proceso de optimización del test M2N–ELISA _____	59-61
Tabla N° 07. Absorbancia relativa de diluciones seriadas de la muestra positiva Rap42 frente a diluciones seriadas del antígeno M2N _____	65
Tabla N° 08. Absorbancia relativa de diluciones seriadas de la muestra negativa CN/LC-01 frente a diluciones seriadas del antígeno M2N _____	66
Tabla N° 09: Diluciones seriadas de las muestras positiva (Rap42) y negativa (CN/LC-01) frente a dos tipos de antígeno M2N; ASTL _____	67
Tabla N° 10: Ratio de unión entre las absorbancias de muestra positiva (Rap42) y negativa (CN/LC-01) frente a dos tipos de antígeno M2N y ASTL _____	68
Tabla N° 11. Muestras identificadas como positivas y distinguidas como negativas empleando el test M2N–ELISA _____	72
Tabla N° 12. Muestras identificadas como positivas y distinguidas como negativas empleando el test ASTL–ELISA _____	72

Tabla N° 13. Sensibilidad y Especificidad diagnóstica primarias de los test de ELISA	75
Tabla N° 14. Especificidad analítica y reactividad cruzada de los test de ELISA	80
Tabla N° 15. Capacidad predictiva diagnóstica de los test de ELISA basados en M2N y ASTL	83
Tabla N° 16. Precisión analítica de los test de ELISA	94

ANEXOS

Anexo N° 01. Aprobación ética de la presente investigación

Anexo N° 02. Protocolo ELISA N°01

Anexo N° 03. Protocolo ELISA N°02

Anexo N° 04. Protocolo optimizado ELISA N°03

Anexo N° 05. Gráficas de Levey-Jennings en los ensayos de precisión del test

M2N-ELISA

ABREVIATURAS

AbS: Anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa

Ag: Antígeno empleado para el ELISA

AR: Absorbancia relativa

ASTL: Antígeno soluble total de *Leishmania* sp.

BSA: “Bovine serum albumin” (albúmina de suero bovino)

CI: Inducción de expresión de PMR por adición de IPTG al cultivo de *E.coli*

BL21

CN/LC: Control negativo para leishmaniosis cutánea

CV%: Coeficiente de variación

DE: Método de desalinización en columna

DIAL: Método de desalinización por diálisis

DO: Densidad óptica

ELISA: “Enzyme-linked immunosorbent assay” (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)

EPF: Método enzimático de punto final

EsA: Especificidad analítica

EsD: Especificidad diagnóstica

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IY: Índice de Youden

LB: Caldo de cultivo Luria-Bertani

LC: Leishmaniosis cutánea

LCA: Leishmaniosis cutánea americana

LM: Leishmaniosis mucosa

LV: Leishmaniosis visceral

M: Muestra a analizar

M2N: Proteína multiepitópica recombinante con secuencia para corte por trombina

M2N-THE: Proteína M2N con la cola 6*His removida y la trombina eliminada

PBS: Buffer fosfato salino

PER: Proporciones estadísticas de rendimiento de un test diagnóstico (SnD, EsD, EsA, Rx)

PMR: Proteína multiepitópica recombinante

POC: “Point-of-care” (punto de atención primaria de pacientes)

PP: Porcentaje de positividad

Rap: Muestras seleccionadas a partir de la seroteca disponible del proyecto de investigación RAPSODI

RDT: “Rapid diagnostic test” (test de diagnóstico rápido)

RLB: Regresión logística binaria

ROC: “Receiver Operating Characteristic”

Rx: Reactividad cruzada

SD: Desviación estándar

SI: Cultivo de *E.coli* BL21 al cual no se le indujo la expresión de PMR por adición de IPTG

SLB: Sobrenadante obtenido de la centrifugación del lisado bacteriano de un cultivo de *E.coli* BL21 luego de la producción de PMR

SnD: Sensibilidad diagnóstica

SP: Sobrenadante obtenido de la centrifugación de un cultivo de *E.coli* BL21
luego de la producción de PMR

T: Tiempo de producción de PMR

TIA: Tasa de incidencia acumulada

TP: Temperatura de producción de PMR

\bar{X} : media aritmética

RESUMEN

Antecedentes: La leishmaniosis cutánea (LC) es una enfermedad endémica importante en Latinoamérica. Los métodos de serodiagnóstico de LC tienen una sensibilidad variable y reactividad cruzada con la enfermedad de Chagas, mientras que los métodos basados en PCR son altamente sensibles aunque no son fácilmente aplicables en campo. En este trabajo de investigación se produjo y evaluó una nueva proteína multiepitópica recombinante, conformada por 9 epítopes lineales B, como un modo de mejorar el serodiagnóstico de LC.

Métodos: La proteína multiepitópica recombinante producida fue evaluada en un formato de ELISA indirecto y su desempeño fue comparado con el ASTL.

Resultados: El test M2N-ELISA presentó una sensibilidad mayor (94.4%) que el test ASTL-ELISA (88.9%). Especificidades similares fueron obtenidas entre el test M2N-ELISA (95.7%) y el test ASTL-ELISA (97.9%). No se presentó reactividad cruzada con sueros de pacientes chagásicos con el test M2N-ELISA (0%), comparado con el test ASTL-ELISA (100%). La precisión analítica del test M2N-ELISA fue menor del 10%.

Conclusión: Este enfoque basado en un antígeno multiepitópico ofrece una opción alternativa prometedora para el diagnóstico de LC humana, con el potencial de superar las limitaciones de los inmunoensayos basados en ASTL.

Palabras clave: Leishmaniosis cutánea, *Leishmania braziliensis*, epítopes lineales, proteína multiepitópica, serodiagnóstico, sensibilidad, especificidad, reactividad cruzada.

ABSTRACT

Background: Cutaneous leishmaniasis (CL) is an important endemic disease in Latin America. Serological diagnosis methods for CL are insufficiently sensitive, while the highly sensitive PCR-based methods are not readily applicable in the field. Traditional serological diagnosis using total crude soluble leishmanial antigen (TSLA) is hampered by variable sensitivity and cross-reactivity with Chagas disease. Here, we produced and tested a novel recombinant multiepitope protein comprising 9 linear B-cell epitopes, as a means to improve the serological diagnosis of CL.

Methods: The produced multiepitope protein was tested in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) format and its performance compared with TSLA.

Results: The M2N-ELISA showed higher sensitivity (94.4%) than TSLA-ELISA (88.9%). Comparable specificities were obtained for M2N-ELISA (95.7%) and TSLA-ELISA (97.9%). There were no cross-reactions with chagasic patients' sera by M2N-ELISA (0%), as compared to TSLA-ELISA (100%). The analytical precision estimated for M2N-ELISA was less than 10%.

Conclusion: This multiepitope-based antigen approach offers a promising alternative option for human CL diagnosis, with the potential to circumvent the drawbacks of TSLA-based assays.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania braziliensis*, linear epitopes, multiepitope protein, serodiagnosis, sensitivity, specificity, cross-reactivity.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis cutánea americana (LCA) es una enfermedad parasitaria que provoca significativa morbilidad y pérdidas económicas en Perú y otras regiones de América Latina (1, 2). El diagnóstico temprano es esencial para el tratamiento oportuno de los pacientes (3, 4). No se cuenta con pruebas de diagnóstico óptimas; el frotis de la lesión o el cultivo del parásito no son suficientemente sensibles, mientras que las tecnologías moleculares están limitadas a laboratorios de referencia debido al requerimiento de una infraestructura especializada y experiencia técnica, por lo que no son adaptables a la rutina de diagnóstico en centros de salud de atención primaria en zonas rurales (1, 5). Las pruebas serológicas tienen potencial de ser desarrolladas para uso en puntos de atención a pacientes. En el caso de LC (del viejo y nuevo mundo), los pacientes presentan bajos niveles de anticuerpos circulantes (5–7). El diagnóstico serológico tradicional basado en el empleo del antígeno crudo de *Leishmania* sp (mezcla de antígenos complejos) tiene la limitación de un desempeño variable en cuanto a sensibilidad y muestra reacciones cruzadas con otras infecciones, en particular con *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, que circula en las mismas áreas endémicas (8–19). El empleo de proteínas multiepitópicas recombinantes (construidas mediante la unión de secuencias codificantes de epítopes teóricamente inmunodominantes de *Leishmania* sp en un gen sintético) ha mostrado una mejora notable en la sensibilidad y/o especificidad de los inmunoensayos (ELISA) en comparación con antígenos crudos para el serodiagnóstico de leishmaniosis visceral humana y canina (20–22).

Gracias a la colaboración entre los Laboratorios de Pathoantígenos y de Bioinformática y Biología Molecular de la UPCH, se cuenta con 19 epítopes candidatos para inmunodiagnóstico de LCA. Estos epítopes fueron obtenidos mediante una predicción con herramientas bioinformáticas a partir del genoma y secretoma parcial de *Leishmania braziliensis*, y constituyen péptidos lineales de alta afinidad teórica a alelos humanos MHC-II y alta especificidad para prevenir reacciones cruzadas (23–26). Mediante la unión de las secuencias de ADN codificantes de 9 epítopes candidatos se construyó un gen sintético para una proteína multiepitópica con potencial valor para el serodiagnóstico de la LCA.

En el presente proyecto de investigación se buscó desarrollar y validar analíticamente un sistema de ELISA indirecto para el diagnóstico de LC, para el cual se empleó como antígeno potencial la proteína multiepitópica recombinante “M2N”. Ésta se enfrentó a muestras de pacientes afectados por LCA, provenientes del Departamento de Cusco, región endémica de leishmaniosis debida principalmente a *Leishmania braziliensis*.

I. GENERALIDADES

1.1. Planteamiento de la investigación.

La leishmaniosis es definida como un conjunto de enfermedades parasitarias producidas por protozoarios intracelulares del género *Leishmania* spp y transmitidas por un insecto vector del género *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) o *Lutzomyia* (en América) (1). Se conocen tres formas clínicas principales, denominadas leishmaniosis Visceral (LV), Mucocutánea (LMC) y Cutánea (LC) (7). La manifestación clínica típica de la LC es la formación de una úlcera en la piel alrededor del sitio de la picadura por el insecto vector, la cual permanece de manera crónica o puede curarse espontáneamente (5).

Para el año 2012, cerca de doce millones de personas en el mundo se encontraban afectadas por la leishmaniosis y se estima que hay alrededor de 2 millones de casos nuevos por año (7). Cerca de 350 millones de personas viven en zonas endémicas de alto riesgo repartidas entre 98 países que incluyen América central y del sur, Oriente medio, Norte de África y Sur de Europa. Alrededor del 90% de casos con LC se reportan en 8 países: Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudí, Argelia, Irán, Brasil, Perú (2).

En vista que la leishmaniosis representa un problema de salud pública en países en vías de desarrollo se requiere de métodos de diagnóstico rápidos, específicos, sensibles y precisos (3, 4). En la actualidad, los métodos de diagnóstico de leishmaniosis incluyen técnicas parasitológicas, serológicas, y moleculares (5). Todas estas técnicas presentan limitaciones importantes. Por ejemplo, el excesivo tiempo empleado en el crecimiento del parásito en

cultivo así como las limitaciones a nivel de la sensibilidad de los métodos parasitológicos. Igualmente, los métodos serológicos (ELISA, IFI) presentan frecuentes problemas en cuanto a la sensibilidad y especificidad, especialmente en el diagnóstico de LC. Esto último es debido a la presencia de bajas concentraciones de anticuerpos contra el parásito *Leishmania* spp. en el suero, dado que éste despierta una respuesta inmunológica predominantemente celular en personas afectadas con LC (del viejo y nuevo mundo) (5, 6). En contraste, el diagnóstico molecular ha probado ser muy específico, sensible y rápido comparado con las técnicas convencionales; sin embargo, su sofisticación con respecto a equipos, reactivos y entrenamiento especializado del personal lo alejan de los centros endémicos donde se requieren métodos de diagnóstico inmediatos para pacientes sintomáticos y casos con sospecha de leishmaniosis, a fin de iniciar oportunamente el tratamiento (1, 5).

Los diferentes test de ELISA desarrollados para el serodiagnóstico de LC y LV están basados mayormente en el uso del ***antígeno soluble total de promastigotes de Leishmania* spp. (ASTL)** (8, 9). Estos test de ELISA indirecto tienen características desfavorables a nivel de la sensibilidad, especificidad y sobre todo por la presencia de reacciones cruzadas con infecciones afines. Tal como lo muestran los resultados obtenidos en un estudio comparativo de varios test de ELISA, realizado el 2009, el cual reveló que un test de ELISA indirecto para el diagnóstico de LV (que emplea ASTL) brinda una sensibilidad diagnóstica de 90%; una especificidad diagnóstica promedio de 80%; una reactividad cruzada entre el

20% al 50% con la enfermedad de Chagas, entre el 50% al 87.5% con Toxoplasmosis y entre el 30% al 56.6% con Paracoccidiomicosis (10). De manera similar, la evaluación de un test de ELISA basado en ASTL de *L.major*, desarrollado el 2014 como prueba comparativa para el serodiagnóstico de LC, evidenció valores de sensibilidad de 88.3%, especificidad de 100% y reactividad cruzada para la enfermedad de Chagas de 91.3% (11). Los autores de los estudios mencionados anteriormente indicaron que la especificidad analítica es baja debido a una alta probabilidad de uniones promiscuas (cruzadas) de las proteínas del ASTL con anticuerpos circulantes de infecciones relacionadas como la enfermedad de Chagas y malaria (10, 11). Así mismo, se han desarrollado varias pruebas de ELISA para el diagnóstico de LC basadas en ASTL y diferentes preparaciones antigénicas derivadas de éste, aunque su uso no es muy frecuente porque estos test presentan altos valores de reactividad cruzada con otras infecciones (12–19).

Con el propósito de mejorar las características de los test de ELISA basados en ASTL, en los últimos años se han desarrollado nuevos test de ELISA indirectos basados en epítopes oligopeptídicos, predichos por mapeo de epítopes *in vitro* o por herramientas bioinformáticas (sea de manera individual o en la forma de proteínas multiepitópicas), que han demostrado mejores niveles de sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, entre los años 2011 y 2012 se han evaluado varios oligopéptidos conjugados a albúmina de suero bovino en un sistema de ELISA indirecto para el diagnóstico de LV obteniendo una sensibilidad de hasta 88.79% y una especificidad de hasta

95% (20, 21). En el caso de “proteínas multiepitópicas recombinantes” (PMR), éstas fueron probadas para uso en diagnóstico serológico de diversas patologías, tales como leishmaniosis visceral (22), toxoplasmosis (27), lepra (28), enfermedad de Chagas (29) y dengue (30). Con respecto a leishmaniosis visceral, un estudio del 2015 evaluó dos PMRs para dos test de ELISA indirecto para el serodiagnóstico de LV en perros. Los resultados evidenciaron que las PMRs brindan mejores valores de sensibilidad (84.9%) en comparación con el ELISA basado en antígeno crudo (64.5%) y una técnica inmunocromatográfica DPP (72.9%); aunque los valores de especificidad obtenidos fueron medianos (65.6%) en comparación con el ELISA basado en ASTL (100%) y la técnica DPP (90%) (22). Por otra parte, otro estudio del 2015 evaluó un test de ELISA indirecto para el serodiagnóstico de LC empleando como antígeno a una proteína recombinante “Catepsina tipo L” derivada de *L. braziliensis*; como resultados obtuvieron altos valores de sensibilidad diagnóstica (96.92%) y especificidad diagnóstica (95.71%), y bajos valores de reactividad cruzada frente a la enfermedad de Chagas (5%) (31).

El uso de PMR en el desarrollo de sistemas de ELISA indirecto para el diagnóstico de LCA aún no se ha implementado. Por tal motivo, en colaboración con el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia se realizó una predicción *in-silico* (a partir del genoma y secretoma de *Leishmania braziliensis*) de secuencias peptídicas como potenciales candidatos a epítopes y se construyó una secuencia

multiepitópica (denominada “M2N”) mediante la unión de 9 epítopes candidatos.

1.2. Planteamiento del problema.

Para el control adecuado de la LCA es necesario el diagnóstico temprano de la enfermedad, para lo cual se requiere de técnicas diagnósticas asequibles, rápidas, exactas, sensibles, capaces de ser estandarizadas y fáciles de usar por el personal de salud en los centros de atención al paciente. Existe la necesidad de herramientas diagnósticas, con tales características, en áreas endémicas de LC en América Latina.

La técnica serológica de ELISA es una herramienta con valioso potencial para el serodiagnóstico de LCA. Los test de ELISA convencionales se basan en el uso del antígeno soluble total de *Leishmania* sp, los cuales, por lo general presentan bajos niveles de sensibilidad así como reactividad cruzada con la enfermedad de Chagas. Se requiere mejorar el desempeño de tales test de ELISA con la evaluación de nuevos antígenos potenciales, tales como las proteínas multiepitópicas.

Con miras a desarrollar una prueba de serodiagnóstico con óptimo desempeño para LCA, postulamos que serán de utilidad epítopes lineales de células T de unión a moléculas MHC-II, teóricamente altamente inmunogénicos y derivados de *Leishmania braziliensis*, predichos por métodos bioinformáticos.

1.3. Marco Teórico.

1.3.1. Leishmaniosis.

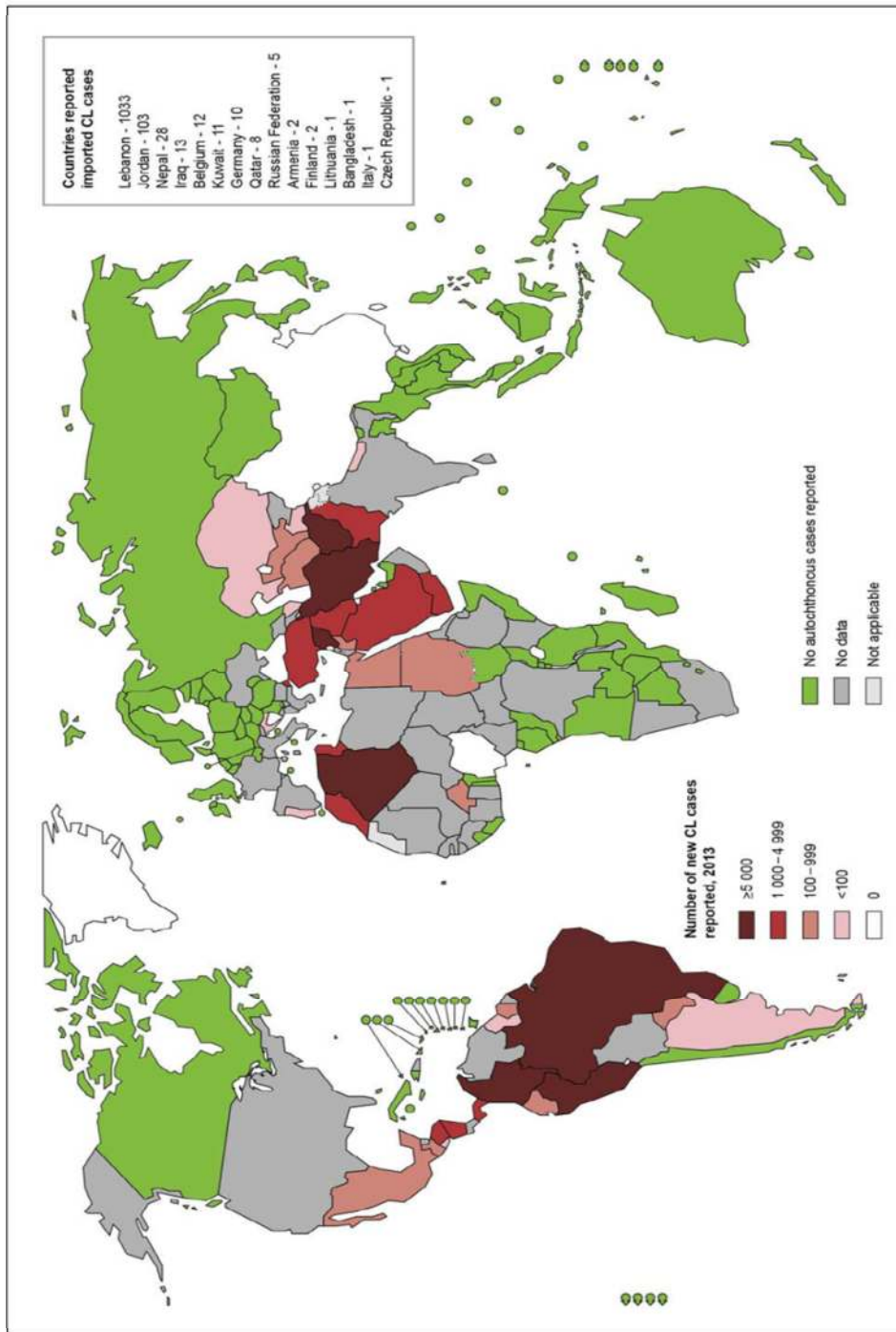
La leishmaniosis está descrita como un conjunto de enfermedades infecciosas ocasionadas por cerca de 17 especies del género *Leishmania* sp. (32). Éstos son parásitos unicelulares que se presentan en dos estadios: (i) Promastigote o estadio flagelado y (ii) Amastigote, el cual es intracelular obligado (1). El parásito se transmite de un individuo (o animal) infectado a otro sano mediante la picadura de las hembras de una mosca flebótoma del género *Lutzomyia* sp. la cual embebe los amastigotes de *Leishmania* sp, que están inmersos dentro de los macrófagos, al alimentarse de la sangre de un individuo infectado. Luego el parásito, dentro del intestino de la mosca, se transforma a su estadio promastigote desarrollando un flagelo que le otorga la movilidad necesaria para emerger hacia las piezas bucales del insecto para finalmente ser inoculados a un individuo sano. Los promastigotes inoculados evaden, en primera instancia, la respuesta inmunológica de neutrófilos y macrófagos para asegurar su supervivencia dentro de dichas células. De esta manera se completa el ciclo de transmisión de la leishmaniosis (6, 33).

En el ámbito clínico, la leishmaniosis se distingue en tres formas clínicas diferenciadas por la profundidad y gravedad de las lesiones y la respuesta inmune del individuo frente a la infección: (i) Leishmaniosis cutánea (LC); (ii) Leishmaniosis mucocutánea (LMC) y (iii) Leishmaniosis visceral (LV) (7). La leishmaniosis cutánea americana (LCA) es mayormente causada por especies del subgénero *Leishmania* (*Viannia*); se caracteriza por la

formación de úlceras anulares alrededor de la zona de la piel donde el insecto infectó al individuo, estas lesiones son generadas por la destrucción tisular que ocasiona el sistema inmune al intentar destruir al parásito. Dichas lesiones pueden curarse espontáneamente alrededor de la semana 18 de la infección dejando cicatrices deformantes; o por el contrario, pueden persistir de manera crónica complicando aún más el cuadro clínico, que puede desencadenar a la forma mucosa (LM) entre un 1% a 10% de los pacientes infectados con *L. braziliensis*, la cual afecta a los tegumentos mucosos de la boca y nasofaringe (32). Por otra parte, la LV es causada por especies del complejo *Leishmania donovani*; es la forma clínica de más difícil curación y con mayor riesgo de mortalidad al afectar órganos internos blandos (34).

1.3.2. Epidemiología de leishmaniosis cutánea.

En términos epidemiológicos, la LC es una infección tropical al encontrarse las zonas endémicas en países ubicados dentro de los trópicos mundiales. Al año 2012, la LC se encuentra presente en alrededor de 90 países, siendo la gran mayoría naciones de bajos recursos económicos y en vías de desarrollo (Figura N° 01). Para el año 2012 se estimó una incidencia de 0.7 a 1.2 millones de casos de LC en todo el mundo, concentrados en 8 países: Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudí, Argelia, Irán, Brasil, y Perú (2).



Data Source: World Health Organization
 Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
 World Health Organization

The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2015. All rights reserved

Figura N° 01. Estatus endémico mundial de Leishmaniosis cutánea para el año 2013
 (Fuente: World Health Organization)

1.3.2.1. Epidemiología de leishmaniosis cutánea americana en el Perú.

En el Perú, la LCA es la tercera infección tropical en importancia, tomando en cuenta la incidencia acumulada anual, después de la tuberculosis y la malaria. La enfermedad está ampliamente difundida en el territorio nacional conformando cerca del 74% de superficie del país, concentrándose más en la selva alta y los andes orientales (Figura N° 02). Tradicionalmente, la LCA se ha denominado como “*Uta*” en la franja andina occidental mientras que en la franja andina oriental y selva alta se le conoce como “*Espundia*” (35).

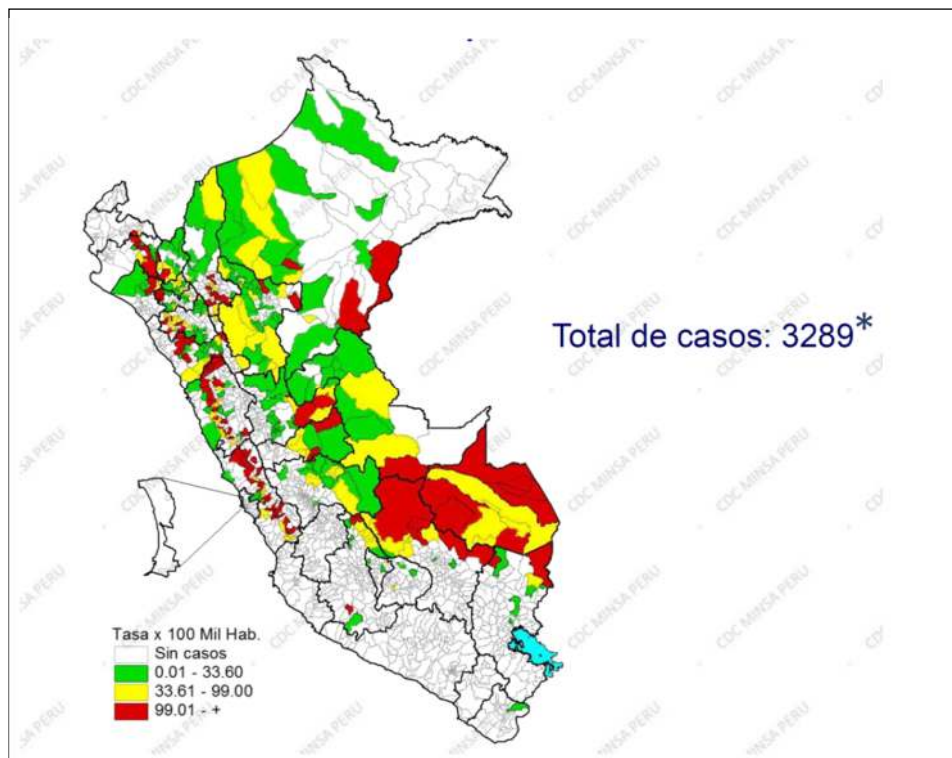


Figura N° 02: Mapa de la Tasa de Incidencia Acumulada de leishmaniosis cutánea americana por distritos, Perú, 2016*

Fuente: Cabrera y col. (36)

(*) : hasta la semana 29 del 2016

En la Figura N° 03, se puede observar que desde el año 2004 al 2016, el promedio del número de casos anuales de LCA ha sido de 6512, con el 2011 como el año con más casos anuales (9353) mientras que el año 2015 posee la menor cantidad de casos anuales (5097) (36).

La tasa de incidencia acumulada (TIA) de LCA por cada 100 000 hab. ha tenido una marcada tendencia ascendente desde el año 1994 hasta el 2012, tal como se observa en la Figura N° 04. Por otra parte, los departamentos de Madre de Dios, Amazonas, San Martín y Cusco son los de más alto riesgo para LCA, puesto que concentran la mayor cantidad de casos anuales y las mayores TIA del país (Figura N° 05) (37).

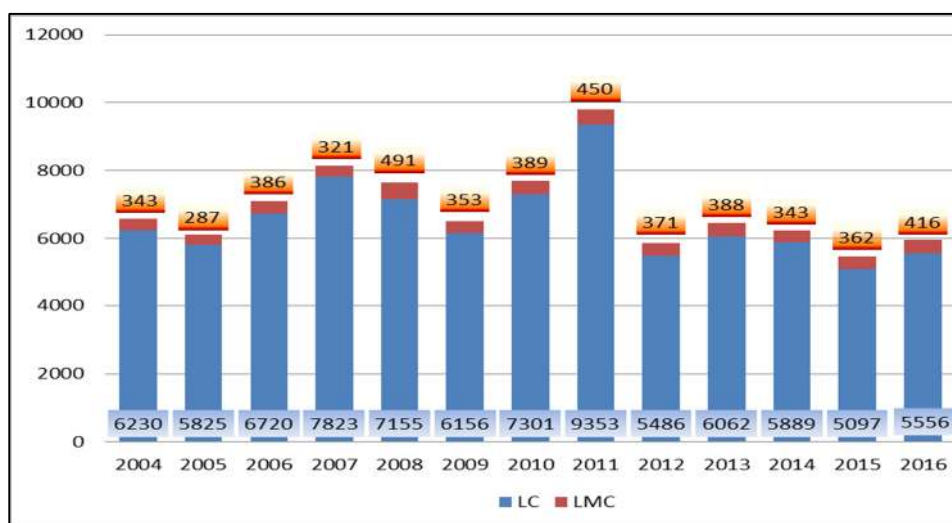


Figura N° 03: Número de casos confirmados por año de leishmaniosis cutánea americana y leishmaniosis mucocutánea en Perú.

Fuente: DGE - MINSa (36)

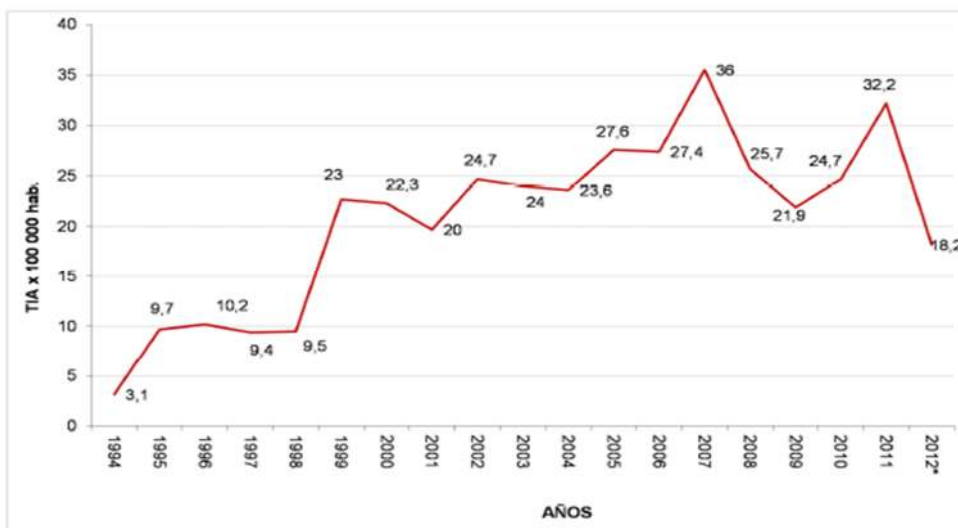


Figura N° 04: Tendencia e incidencia acumulada de la leishmaniosis cutánea americana en Perú.

Fuente: Cabrera y col. (37)

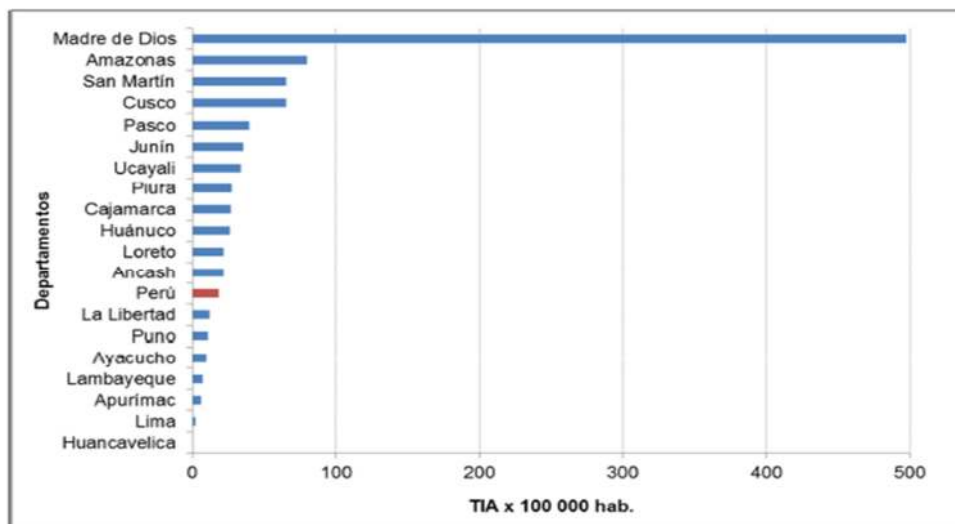


Figura N° 05: Tasa de incidencia acumulada de leishmaniosis cutánea americana por departamentos del Perú.

Fuente: Cabrera y col. (37)

Cabe mencionar que para el año 2012, la TIA de pacientes varones afectados con LCA duplicó a la TIA de pacientes mujeres afectadas. Se ha sugerido que estas diferencias en las TIAs se deben a los hábitos laborales de los varones en las zonas endémicas, al ser ellos los que realizan más trabajo en campo y se encuentran más expuestos a la transmisión de la infección por picadura que las mujeres (37).

Por último es importante resaltar que, para el año 2012, los mayores valores de TIA se dieron entre adolescentes y jóvenes adultos menores de 30 años (Tabla N° 01) (37).

Tabla N° 01. Tasa de incidencia acumulada de leishmaniosis cutánea americana por etapas de vida en Perú.

Etapas de vida (años)		Casos	Población 2012	Tasa de incidencia acumulada †
Niñez	(0 - 11)	1277	7028935	18,2
Adolescentes	(12 - 17)	865	3496549	24,7
Juventud	(18 - 29)	1425	6481996	22,0
Adulto	(30 - 59)	1563	10416623	15,0
Adulto mayor	(60 +)	356	2711772	13,1

Fuente: Cabrera y col. (37). † = Tasa de incidencia acumulada / 100 000 hab.

Por otra parte, el número de casos de LMC ha mantenido una tendencia constante, aunque irregular, con un promedio de 374 casos por año (Figura N° 03). Hasta marzo del 2016, el número de casos confirmados de LMC ascendió a 43. La LV no es de importancia endémica al no reportarse casos clínicos ni contener nichos epidemiológicos de la infección en el territorio nacional (36).

1.3.3. Métodos de diagnóstico de leishmaniosis cutánea americana.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que para el diagnóstico confirmatorio de la leishmaniosis cutánea americana (LCA) se usen hasta cinco pruebas de laboratorio a la vez (38). Las técnicas de diagnóstico van desde la observación directa del parásito (microscopía directa) en un frotis preparado a partir de las lesiones cutáneas, la detección de anticuerpos circulantes en muestras de suero del paciente (técnicas de serodiagnóstico), hasta la amplificación mediante PCR de fragmentos característicos del genoma del parásito (por ejemplo, el ADN del kinetoplasto – kDNA, presente en múltiples copias) (1, 5).

1.3.3.1. Métodos de diagnóstico serológico de leishmaniosis cutánea americana.

Si bien las técnicas de serodiagnóstico (IFI y ELISA) se encuentran entre las herramientas primarias dentro del protocolo clínico para el correcto diagnóstico de LV junto con las técnicas parasitológicas, la OMS no recomienda el empleo de dichas técnicas de serodiagnóstico para LCA. Ésto debido a que en la LC (del Nuevo y Viejo Mundo) la respuesta inmunológica es predominantemente del tipo celular; con la consecuencia que los pacientes presentan bajos títulos de anticuerpos circulantes anti-*Leishmania* (6). Aún con una menor cantidad de anticuerpo en la sangre periférica de pacientes con LC, se han desarrollado distintos test basados en la técnica de ELISA para el diagnóstico de tal forma clínica, la mayoría de ellos basados en el empleo

del antígeno soluble total del promastigote de *Leishmania* sp. (ASTL) (12-19).

El ASTL se compone en su mayoría de la fracción proteica soluble del parásito. Para su obtención, el promastigote del parásito se fragmenta mediante el sometimiento a “stress” físico/mecánico (ciclos de calentamiento/enfriamiento y sonicación) para luego eliminar las fracciones insolubles mediante centrifugación (39). La amplia variedad de medio proteico disponible en el ASTL incrementa la probabilidad de obtener la mayor cantidad de antígenos de parásitos causantes de LCA, específicos a anticuerpos circulantes en suero de pacientes infectados; de esta manera se favorece la especificidad y sensibilidad diagnósticas del test de ELISA.

Sin embargo, esta amplia variedad de antígenos disponibles en el ASTL repercuten en la especificidad analítica del test, al promover reacciones cruzadas (promiscuas) con otras enfermedades infecciosas, como la enfermedad de Chagas, malaria, ciertas micosis, etc. Además, la comparación estadística del desempeño de los diversos test de ELISA basadas en ASTL se torna difícil puesto que las preparaciones antigénicas empleadas y las cepas de *Leishmania* spp. son heterogéneas entre laboratorios. A esto se suma el hecho que las cepas de *Leishmania* spp. requieren de mantenimiento constante bajo la supervisión de un personal con experiencia en cultivo celular y microscopía (9–12, 15).

Tomando en cuenta las desventajas del empleo del ASTL como antígeno para un test de ELISA, en los últimos años se han diseñado nuevos test

de serodiagnóstico basados en el uso de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos (11, 20, 21, 31).

En la Tabla N° 02 se observan 11 test de ELISA indirecto desarrollados desde 1980 hasta 2015 para el serodiagnóstico de LC (12-19). A primera vista, se aprecia que la mayoría de los test de ELISA indirecto desarrollados se basan en el empleo de ASTL (y dos variantes) de diversas especies de *Leishmania* como antígeno (13-19). Por otra parte, el empleo de proteínas recombinantes, como por ejemplo la proteína tipo catepsina – rCatL (*Leishmania braziliensis*) (11) y la proteína de choque térmico de 83 kDa – rHSP83 (*Leishmania infantum*) (31) es de uso reciente para el serodiagnóstico de LC. También se observa que el uso de péptidos para el serodiagnóstico de LC data desde 1996 con el empleo del péptido de la proteína del gen B de *L. major* (GBP-Peptide) (40). Aunque el empleo de péptidos es más usual en años recientes, por ejemplo un estudio realizado el 2015 evaluó un péptido derivado de la proteína tipo catepsina (Péptido 1 - CatL) como antígeno para el serodiagnóstico de LC (31).

Tabla N° 02. Test de ELISA indirecto basados en diferentes tipos de antígenos desarrollados desde 1980 hasta el 2015 para serodiagnóstico de LC. Parte I

ELISA												
#	Autor y col (año)	F. Clin. target	Antígeno (A)	Antígeno	Bloqueo	Muestra	AbS	Detección	Sn (%)	Es (%)	Rx. Cx. Chagas (%)	Observaciones
1	Menezes-Souza y col (2015)	LCA	rCatL (<i>L. braziliensis</i>) Péptido 1 (CatL) TSLA (<i>L. braziliensis</i>)	rCatL (2.5 µg/mL) y TSLA (0.5 µg/mL): O/N 4°C Pep1 (10 µg/mL): O/N 37°C	BSA (0.05 g/l) en PBS 1h/37°C	Dil 1:100 1h/37°C	1:5000 1h/37°C	TMB 30'/RT OD: 492/620 nm	rCatL: 96.92; Pep1: 96.92; TSLA: 68.57 (LC, n=135)	rCatL: 95.71; Pep1: 91.43; TSLA: 68.57 (LC, n=50)	Pep1: 5.0 (LV, n=20)	---
2	Celeste y col (2014)	LC/LMCLV	rHSP83 (<i>L. infantum</i>)/TSLA (<i>L. major</i>)	1 mg/mL / 50 µL/pozo. Buffer C/B O/N 4°C	BSA 1% en PBS-T 200 µL/pozo	Dil 1:50 en buffer bloqueo	En buffer bloqueo	Acido 5-aminosalicilico/H ₂ O ₂ Detenido: NaOH 1M OD: 450 nm	rHSP83: 100; TSLA: 88.33 (LC, n=12)	rHSP83: 100 TSLA: 100 (n=30)	rHSP83: 0 TSLA: 91.3 (n=23)	Empiezan unidades arbitrarias de reporte de ELISA (% reactividad)
3	Manetti y col (2014)	LCA	Antígenos membrana promastigote de <i>L. braziliensis</i>	3 µg/50µL pozo. Buffer C/B O/N 4°C	BSA 1% en PBS 200 µL/pozo	Dil 1:150/ BSA 1% / 100 µL/pozo 2h/25 °C	a-IgG-Per 1:1000 100 µL/pozo 2h/25 °C	OPD 15'/25°C OD: 492/620 nm	93.3 (n=60)	95.5 (n=66)	77.2 (n=57)	---
4	Al-Nahhas (2009)	LC	TSLA (<i>L. mexicana</i>)	---	---	1:100 en PBS 2h / RT	a-IgG-Per 1:1000 en PBS 30' / RT	3-EHTNS (2,2 azinobis) 20' / RT OD: 450 nm	92.5 (n=270)	---	---	Los Sueros fueron colectados durante 3 años. Se emplearon 20 sueros de pacientes no infectados con LC como "controles negativos"
5	Gomes-Silva (2008)	LC/LV	PSLA (proteína soluble de <i>L. amazonensis</i> y <i>L. braziliensis</i>)	1 µg/pozo / 50µL Buffer C/B O/N 4°C	---	Dil: 1:40 50µL suero de cabra 10% 45'/37°C	a-IgG-Per Dil 1:2000 45'/37°C	OPD OD: 492 nm	91 (ConA / <i>L. braziliensis</i>) 41 (ConA / <i>L. amazonensis</i>) (n=58)	57 (ConA / <i>L. braziliensis</i>) 54 (ConA / <i>L. amazonensis</i>) (n=49)	---	Separaron la fracción proteica mediante cromatografía de afinidad con resinas ConA y Jaca Agarosa
6	Geraldo y col (2007)	LCA	TSLA (<i>L. braziliensis</i>)	10 µg /pozo Buffer C/B O/N 4°C	BSA 1% en PBS 2h/25°C	Dil 1:150 en buffer bloqueo/ 2h, 25°C 100 µL/pozo	a-IgG-Per 1:5000 100 µL/pozo 2h/25°C	OPD 15'/RT OD: 492/620 nm	93 (n=72)	94.8 (n=38)	94.5% (n=36)	---

Legend a. Sn: Sensibilidad; Es: Especificidad; Rx Cx: Reactividad Cruzada; F. Clin: Forma clínica; rCatL: Proteína recombinante tipo cataplasma; HSP83: Heat Shock Protein 83kDa; Abs: anticuerpos secundarios; LC: Leishmaniosis cutánea; LMCLV: Leishmaniosis mucocutánea; LV: Leishmaniosis visceral; a-IgG-per: a-IgG-peroxidasa; BSA: Albumina de suero bovino.

Tabla N° 02. Test de ELISA indirecto basados en diferentes tipos de antígenos desarrollados desde 1980 hasta el 2015 para serodiagnóstico de LC. Parte II

ELISA												
#	Autor y col (año)	F. Clín. target	Antígeno (A)	Antígeno	Bloqueo	Muestra	Abs	Detección	Sn (%)	Es (%)	Rx. Cx. Chagas (%)	Observaciones
7	Yıldız (2007)	LC	TSLA (<i>L. infantum</i>)	5 µg/pozo O/N 4°C	--	Dil: 1:100 Buffer Cascina 1h / 37°C	Dil: 1:5000 1h / 37°C	3-EBTNS (2,2 azinobis) 20' / RT OD: 450 nm	78 (n = 113)	95.3 (n = 29)	---	---
8	Ryan (2002)	LC/LV	TSLA - exantigeno: LC: <i>L. mexicana</i> LV: <i>L. donovani</i>	5 µg/pozo	Cascina 1% en PBS / RT 1 h / RT	Dil: 1:1000 40' / 26°C	Dil: 1:5000 1h / 26°C	TMB RT OD: 450/650	92.31 (n = 143)	100 (n = 12)	---	---
9	Jensen y col(1996)	LC	geneB prolein peptide (<i>L. major</i>) / TSLA (<i>L. major</i>)	Buffer C/B O/N 4°C	BSA 1%, triton X-100 0.1%, 1h, RT 100 µL/pozo	Dil: 1:10 en buffer bloqueo/ 1h, RT 100 µL/pozo	a-IgG-Per 1:6000 100 µL/pozo 1h/RT	OPD 5'/RT OD: 492/620 nm	82 (GBPP) 67 (TSLA) (n = 33)	100 (GBPP/ TSLA) (n = 36)	Malaria 0 (GBPP/ TSLA) (n = 11)	Emplearon unidades arbitrarias de reporte de ELISA (% reactividad)
10	Mosleh y col(1995)	LC	TSLA (<i>L. major</i>)	300 µL/well Buffer C/B O/N 4°C	--	Dil. 1:50 - 1:800 300 µL/well En PBS-T 2h/ RT	a-IgG-PAL Dil. 1:500 300 µL/well En PBS-T 2h/ RT	p-NPP 30' / RT OD: 400 nm	2.8 (1:50) 81 (≥1:100) (n = 37)	97 (1:50) 96 (≥1:100) (n = 100)	10 (TBC) 6 (F. tifoidea) (n = 10)	Para el ensayo de ELISA se basaron en Voller y col (1976)
11	Roffi y col(1980)	LC	TSLA (<i>L. major</i>)	3 µg/µL, Buffer C/B O/N 4°C	--	Dil. 1:40 - 1:320/ PBST/ 200 µL 3h/RT	a-IgG-Per 1:1500 200 µL/pozo 3h/RT	Ortodianisina 60'/RT OD: 400 nm	97 (n = 33)	98.8* (n = 167) 92.6** (n = 121)	Malaria 11.7% (n = 17)	Antes del coating las placas fueron tratadas 1h con glutaraldehído 1%

Legend a. Sn: Sensibilidad; Es: Especificidad; RxCx: Reactividad Cruzada; F. Clín: Forma clínica; rCatL: Proteína recombinante tipo catepsina; HSP83: Heat Shock Protein 83kDa; Abs: anticuerpos secundarios; LC: Leishmaniosis cutánea; LMC: Leishmaniosis mucocutánea; LV: Leishmaniosis visceral; a-IgG-per: a-IgG-peroxi dasa; BSA: Albumina de suero bovino.

1.3.4. Relevancia de las técnicas serológicas y de los antígenos mimotópicos en el diagnóstico de leishmaniosis cutánea americana.

Las técnicas de serodiagnóstico son capaces de brindar elevados niveles de sensibilidad, especificidad diagnósticas y precisión empleando equipos de bajo costo con operatividad simple que facilitan la portabilidad de la técnica hacia nichos endémicos donde es necesario el control clínico y epidemiológico de manera inmediata, como por ejemplo en los caseríos y poblados rurales de los departamentos de Cusco y Madre de Dios en Perú. Además, la técnica de ELISA es versátil al poder optimizar y/o rediseñar los parámetros de análisis (temperaturas y tiempos de incubación, cantidad y carga de reactivos, etc) empleando insumos asequibles en comparación con las técnicas moleculares. Por último, la técnica de ELISA permite procesar varias muestras a la vez en un tiempo relativamente corto entregando resultados que expresan de manera categórica la cantidad de anticuerpos circulantes presentes en las muestras de suero de pacientes infectados (títulos de anticuerpo expresados en porcentaje de positividad o absorbancia relativa), por lo cual la técnica de ELISA es semi-cuantitativa (41, 42).

Todas estas ventajas se ven potencialmente incrementadas con el uso de **antígenos mimotópicos** (proteínas recombinantes y péptidos), los cuales presentan menor variabilidad antigénica en comparación con el ASTL lo que favorece la especificidad analítica de la técnica de ELISA, aunque una potencial desventaja es la disminución de la sensibilidad analítica de la técnica al disminuir las probabilidades de unión afín entre antígeno y

anticuerpo a una sola proteína, e incluso a una sola secuencia epitópica (péptido). Sin embargo, en la última década se han evaluado tres test de ELISA indirecto basados en tres antígenos mimotópicos (la proteína recombinante rCatL, la proteína recombinante rHSP83 y el “péptido 1” derivado de rCatL) obteniendo valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica elevados (96.9% y 95.7% para la rCatL; 100% y 100% para la rHSP83 respectivamente) y con valores de reactividad cruzada para la enfermedad de Chagas entre 0 y 5% (11, 31).

Estos resultados son bastante alentadores para el desarrollo de antígenos recombinantes más complejos como las proteínas multiepitópicas. Estas son proteínas recombinantes que codifican dentro de su secuencia a potenciales epítipes (mimótopos) lineales para células B obtenidos mediante el uso de herramientas bioinformáticas de predicción de epítipes. Tomando en cuenta la evidencia reportada en la literatura a partir del ensayo de varias proteínas multiepitópicas, consideramos que las mayores ventajas del uso de proteínas multiepitópicas recombinantes (PMR) son (22, 27-30): (i) incrementarían la probabilidad de unión de los anticuerpos anti-*Leishmania* con los epítipes contenidos en una sola secuencia de proteína, de esta manera se reforzaría la sensibilidad diagnóstica; (ii) la unión de los anticuerpos a las PMR se espera sea mucho más específica puesto que las secuencias epitópicas empleadas en su construcción pasaron por diversos filtros *in silico* al momento de la predicción bioinformática (entre ellos: la conservación de secuencias peptídicas entre los genomas de *Leishmania* spp.; el grado más bajo de

reactividad cruzada con el proteoma humano y microbioma humano); y (iii) las PMR se emplean desnaturalizadas, por lo tanto, se facilitarían los procesos de purificación y la técnica de ELISA incrementa su versatilidad.

1.3.5. Proteína multiepitópica “M2N”.

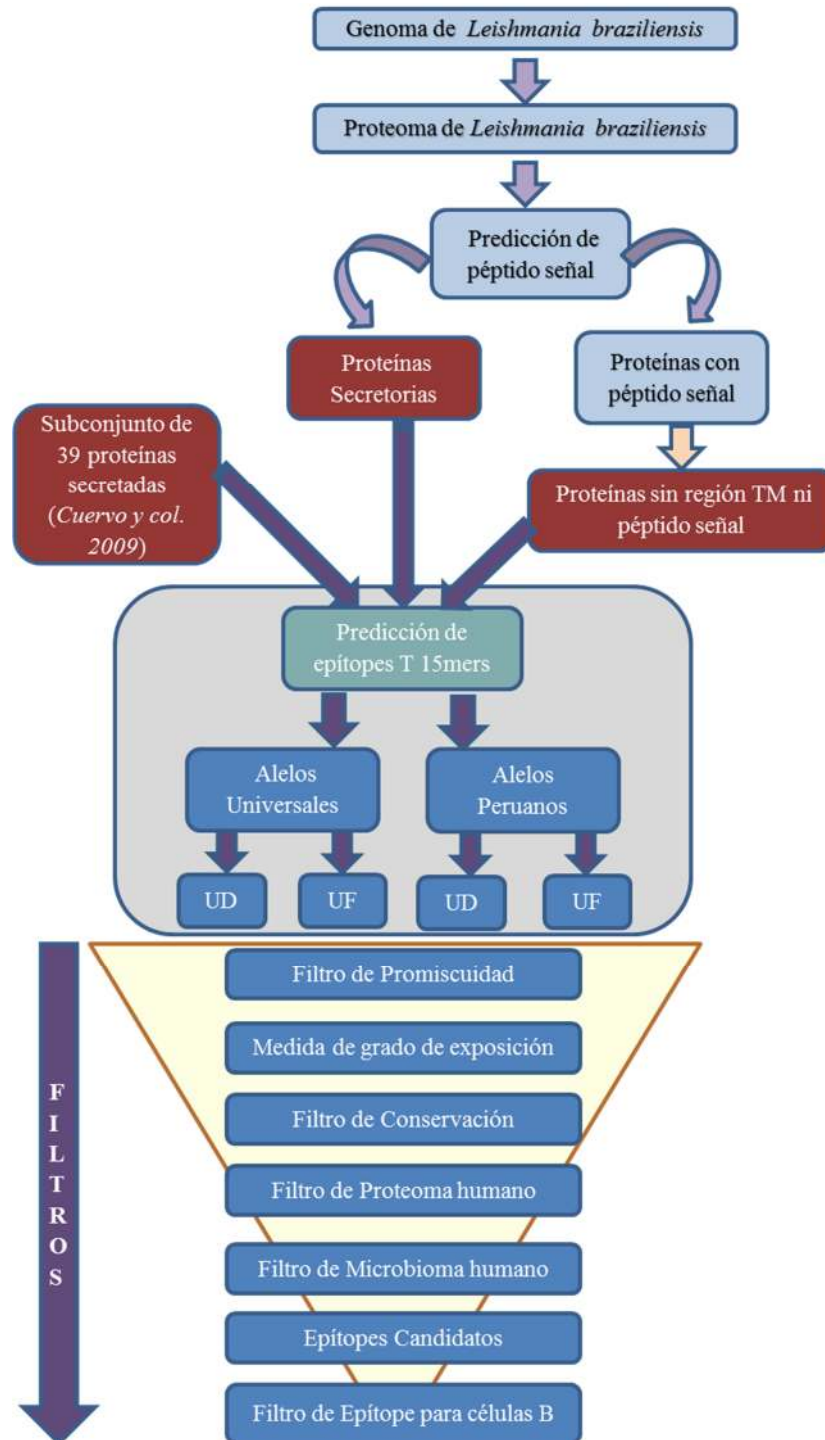
La predicción bioinformática de la PMR evaluada en este estudio se realizó en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

La construcción de la PMR partió de la predicción bioinformática (Flujograma N° 01) de epítopes lineales para células T – presentados por moléculas de MHC clase II– a partir de: (i) el genoma completo de *Leishmania braziliensis* (disponible en la base de datos del NCBI y traducido *in silico*), y (ii) de la secuencia aminoacídica de 39 proteínas secretadas (secretoma parcial) potencialmente antigénicas de esta especie (43). A partir de ambos enfoques se buscaron secuencias con péptido señal (en la búsqueda de proteínas secretadas) y con región transmembrana. Las secuencias de las proteínas seleccionadas pasaron por un predictor de epítopes [NetMHCIIpan server] (23). Se predijeron epítopes lineales T clase II de 15mers para alelos globales (supertipos) de HLA (5 alelos HLA-DPA1, 6 alelos HLA-DQA1, 11 alelos HLA-DRB1) y 8 alelos peruanos HLA-DRB1 (24, 25) (Tabla N° 03). Las secuencias epitópicas resultantes pasaron por varios filtros, en el orden como sigue: (i) promiscuidad de unión de los epítopes para los diferentes alelos de HLA

analizados; (ii) grado de exposición al solvente (con la finalidad de asegurar que los epítopes predichos estén expuestos en la superficie de la proteína nativa, de tal manera que sean de fácil acceso y reconocimiento para los anticuerpos); (iii) conservación de las secuencias peptídicas entre especies de *Leishmania* (en base a los genomas reportados); (iv) conservación cruzada con el proteoma humano (para la obtención de epítopes que no sean autoreactivos, evitándose que los epítopes puedan inducir tolerancia y no sirvan para el reconocimiento de anticuerpos); (v) conservación cruzada con el microbioma humano; (vi) como paso final, los epítopes T candidatos que pasaron con éxito los filtros anteriores fueron sometidos a un predictor de epítopes lineales para células B [servidor LBtope] (26), a fin de garantizar que podrán ser reconocidos por anticuerpos circulantes en una prueba de inmunodiagnóstico. Se predijeron 19 epítopes, de los cuales se eligieron 9 (Tabla N° 04).

Flujograma N° 01. Predicción bioinformática de epítopes lineales

MHC-II para linfocitos T y B.



TM: región transmembrana; **UF:** Unión fuerte del epítope al HLA; **UD:** Unión débil del epítope al HLA.

Tabla N° 03. Alelos de MHC clase II seleccionados para la predicción de epítopes lineales para linfocitos T y B.

Alelos globales		Alelos Peruanos
HLA DPA1 * 02:01 - DPB1* 01:01	DRB1 * 01:01	DRB1 * 0401
HLA-DPA1 * 01:03 - PDB1* 02:01	DRB1 * 03:01	DRB1 * 0403
HLA-DPA1 * 01:03 - DPB1* 04:01	DRB1 * 12:01	DRB1 * 0404
HLA-DPA1 * 01:03 - DPB1* 04:02	DRB1 * 13:02	DRB1 * 0405
HLA-DPA1 * 02:01 - DPB1* 05:01	DRB1 * 04:01	DRB1 * 0407
HLA-DQA1 * 01:01 - DQB1* 05:01	DRB1 * 04:04	DRB1 * 0408
HLA-DQA1 * 01:02 - DQB1* 06:02	DRB1 * 04:05	DRB1 * 0410
HLA-DQA1 * 03:01 - DQA1* 03:02	DRB1 * 07:01	DRB1 * 0411
HLA-DQA1 * 04:01 - DQB1* 04:02	DRB1 * 08:02	
HLA-DQA1 * 05:01 - DQB1* 02:01	DRB1 * 09:01	
HLA-DQA1 * 05:01 - DQB1* 03:01	DRB1 * 11:01	

Fuente: Southwood y col. (1998); Gonzalez y col. (2011).

Tabla N° 04. Epítopes seleccionados para el diseño de la proteína multiepitópica.

# Epítope	Secuencia de aminoácidos	Proteína*
Ep.1	<i>PSPPLLNRSLPHTFRFPLV</i>	Proteína putativa conservada
Ep. 3	<i>DQDSYRLVYQRVQRAYGVLGD</i>	Proteína tipo DnaJ
Ep. 5	<i>HQQRHSFLPYLPAAPLALV</i>	ADN polimerasa teta (función hipotética)
Ep. 7	<i>MTVEDFVLALLASPEKVLPNP</i>	Proteína putativa conservada
Ep. 9	<i>IDLVRGFRSMLHASKRIGIEQ</i>	Cadena pesada de Dineína (función hipotética)
Ep. 11	<i>LQLERSFYLMKAYNCLRR</i>	Fosfatidil-glicerofosfato sintasa (función hipotética)
Ep. 13	<i>THVDGWRWFPYFERVELVD</i>	Proteína con repeticiones del dominio ankirina (función hipotética)
Ep. 15	<i>GLLCARLRALQVPPAALKEE</i>	Proteína con repeticiones del dominio ankirina (función hipotética)
Ep. 17	<i>PPLRPDLRRALHHFRLGALQN</i>	Proteína putativa conservada

**L. braziliensis* [genoma de referencia cepa MHOM/BR/75/M2904] de acuerdo a un análisis TBLASTN.

Las secuencias codificantes de los 9 epítopes se ensamblaron en un gen sintético, denominado “M2N”, y se hizo una optimización de codones para su expresión en *E. coli*.

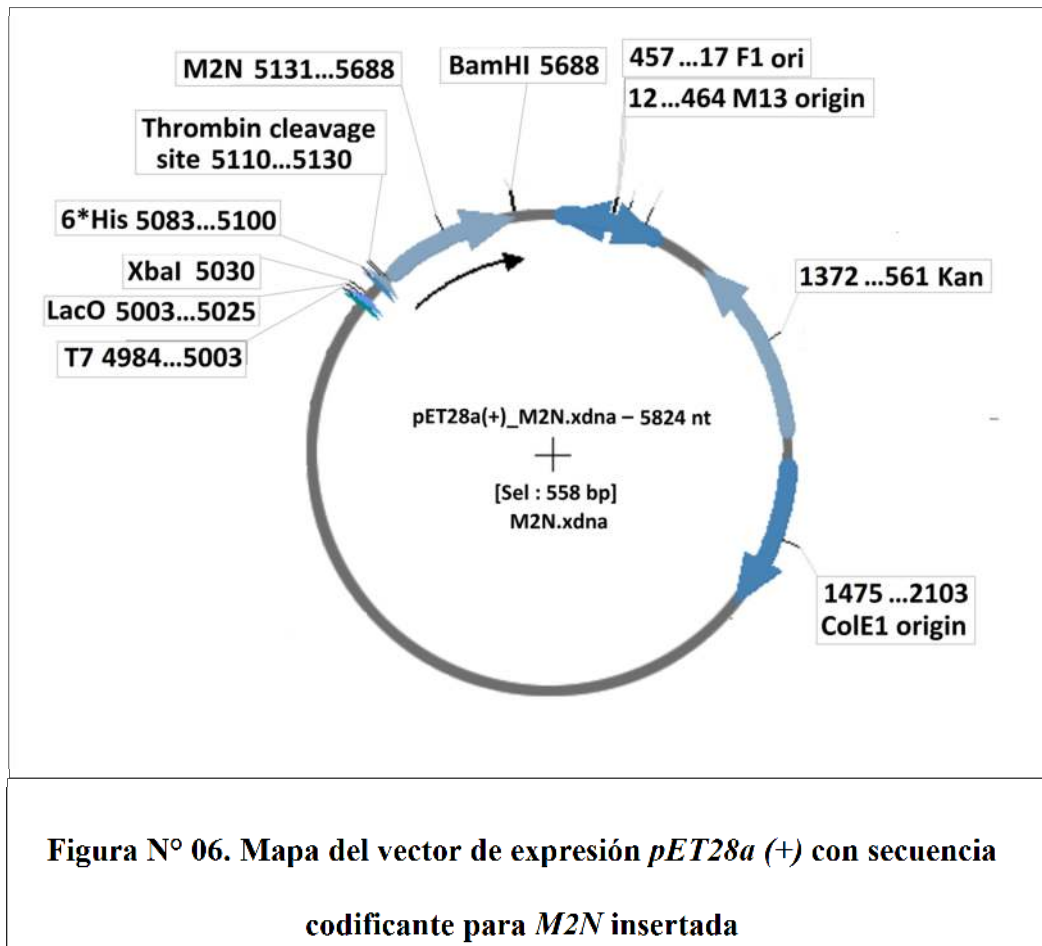
El gen sintético M2N fue sintetizado y clonado en el vector de expresión pET28a(+) (Figura N° 06) por la empresa Genemed Synthesis Inc. (EE.UU.). Dicho vector de expresión permite añadir una secuencia codificante de una cola de 6 histidinas (6*His) al extremo amino-terminal de la proteína a expresar, la cual es útil para el proceso de purificación por cromatografía de afinidad (usando la resina Ni-NTA-Agarosa). Sin embargo, datos internos del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular del LID mostraron evidencia experimental que la cola 6*His genera un alto nivel de *background* en ensayos de ELISA al unirse ésta a los anticuerpos anti-His presentes de manera natural en las muestras de suero humano (Dr. Mirko Zimic, comunicación personal). Debido a ello, se incorporó un sitio de corte para trombina bovina (secuencia LVPRGS) necesario para la escisión de la cola 6*His de la proteína M2N, cuya secuencia de aminoácidos es la siguiente:

>M2N: (pI: 8.93 / Mw: 23357.38 Da)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMGLLCARLRAHQVPPAALKEEIDLVRGFRS
PLHSKRIGIEQEDVQRYFGRVPLFYRHPPLSDQDSYRLVYQRVQRAYGVLEDD
EGHEDVQHFSTLTVAEEYPTHPTLIKSHSARAKARRSVSRKKAIKALKNNNWDI
VNTDMLSQKFALITYEAYNFGGVDEQVQHFSTLTVAEEYYIIK

>Cola 6*His escindida: (pI: 9.61 / Mw: 2184.34 Da)

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH



1.4. Justificación del estudio.

La OMS sugiere que para el diagnóstico de la LCA se empleen de 2 hasta 5 pruebas a la vez. Las técnicas de diagnóstico más usuales son: (i) los métodos parasitológicos, los cuales presentan un amplio rango de sensibilidad (40% al 80%); (ii) moleculares, los cuales son de alto costo y muy sofisticados para ser trasladados a los puntos de atención primaria de los pacientes; y (iii) serológicos, los cuales en su mayoría son test de ELISA indirecto basados en ASTL y tienen la desventaja de ser poco

sensibles y presentar reactividad cruzada con la enfermedad de Chagas; por lo cual no es recomendado por la OMS (1, 9, 10, 38).

Los test de ELISA basados en ASTL están orientados mayormente al diagnóstico de LV, tanto humana como canina, debido a las bajas concentraciones de anticuerpos en muestras de suero de pacientes con LC (5). Aun así, los rangos de sensibilidad son amplios y variables y presentan reacciones cruzadas importantes.

En este contexto, la búsqueda de antígenos con alta especificidad y sensibilidad es esencial para el desarrollo de pruebas que permitan un diagnóstico serológico efectivo de LCA. En años recientes, el empleo de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes multiepitópicas ha proporcionado nuevos antígenos de potencial utilidad para mejorar el serodiagnóstico de leishmaniosis, con la mayoría de estudios enfocados en LV humana y canina (20-22) y pocos en LC (del viejo y nuevo mundo) (31).

Por lo tanto, en el presente estudio, la detección de anticuerpos enfocados contra *Leishmania braziliensis*, empleando una proteína multiepitópica – construida a partir de epítopes lineales de unión afín a MHC-II y teóricamente inmunodominantes, predichos mediante herramientas bioinformáticas – en un formato de ELISA indirecto plantea mejorar el desempeño diagnóstico para la LCA.

1.5.Hipótesis.

Una proteína multiepitópica recombinante, derivada de una aproximación bioinformática enfocada en *Leishmania braziliensis*, tendrá óptimo potencial para la detección de anticuerpos en suero/plasma de pacientes con leishmaniosis cutánea americana.

1.6.Objetivos.

Objetivo general:

Desarrollar y validar analíticamente un ensayo de ELISA indirecto basado en una proteína multiepitópica que consta de epítopes lineales de células T de unión a moléculas MHC-II, predichos *in silico* a partir del genoma y secretoma parcial de *Leishmania braziliensis* de ser específicos y teóricamente altamente inmunogénicos, para el serodiagnóstico de leishmaniosis cutánea americana.

Objetivos específicos:

1. Expresar y purificar la proteína multiepitópica recombinante M2N, y la subsiguiente escisión de la cola 6*His.
2. Optimizar las condiciones del ensayo de ELISA mediante la determinación de: (i) las soluciones *buffer* de fijación y bloqueo; (ii) la concentración óptima de captura del antígeno; (iii) los límites de detección en suero/plasma de casos confirmados de leishmaniosis cutánea; y (iv) la dilución óptima de anticuerpo conjugado-HRP.

3. Determinar los parámetros analíticos del ensayo de ELISA: Cut-off analítico, sensibilidad diagnóstica primaria, especificidad diagnóstica primaria, especificidad analítica frente a sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, y precisión analítica.

II. METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1. Reactivos.

Los reactivos utilizados en el presente trabajo se obtuvieron de las siguientes compañías:

El plásmido recombinante *pET28a(+)-M2N* fue sintetizado por Genemed Synthesis Inc. (EE.UU.). Los reactivos leche descremada (skim milk powder), IPTG (Isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside), trombina bovina y la resina de afinidad para trombina bovina (p-aminobenzamidine agarose) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (EE.UU.). La resina para cromatografía de afinidad Ni-NTA-Agarosa fue adquirida de Invitrogen, Thermo Fisher Scientific (EE.UU.). El marcador de peso molecular para proteínas (CSL-PPL Pink plus prestained protein ladder 10–175 kDa) fue adquirido de Cleaver Scientific (Reino Unido). El anticuerpo anti penta-His (HRP conjugate), el buffer de bloqueo y el reactivo de bloqueo para Western blot fueron adquiridos de Qiagen (Alemania).

2.1.2. Materiales de plástico.

Los materiales de plástico utilizados en el presente trabajo se obtuvieron de las siguientes compañías:

Los tubos para colección de muestras sanguíneas (6 mL BD vacutainer® Plus plastic serum tube) fueron adquiridos de BD (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.). Las columnas de polipropileno de 5 mL para purificación por cromatografía de afinidad fueron adquiridas de Qiagen

(Alemania). Las placas multipocillo para ensayos de ELISA (Corning® 96 well clear flat bottom polystyrene high bind microplate) fueron adquiridas de Corning Life Sciences (EE.UU.).

2.1.3. Equipos de Laboratorio.

Los equipos de laboratorio empleados en el presente trabajo fueron los siguientes:

- Cabina de flujo laminar (Nuair Biological Safety – Class II Type A/B3)
- Centrífuga para tubos Eppendorf de 1.5 mL (Eppendorf 5417R)
- Centrífuga para tubos Falcon (Eppendorf 5810R)
- Electroporador (Gene Pulser II® BIO-RAD)
- Espectrofotómetro UV (Beckam-Coulter DV 720)
- Incubadora (Shaker Lab-Net International 311DS)
- Lavador de placas multipocillo de ELISA (E-Immunowash 1575 - BIORAD)
- Lector colorimétrico para placas multipocillo de ELISA (Mark lector – ELISA BIORAD)
- Rocker (Red Rocker PR50 / Hofer scientific instruments)
- Sonicador (Misonix Sonicator 3000)

2.2 Métodos.

2.2.1. Diseño del estudio.

El presente trabajo de investigación fue un estudio de evaluación de prueba diagnóstica caso – control; donde se estimó la validez analítica de un test de ELISA basado en la proteína multiepitópica M2N y se comparó su desempeño diagnóstico con un test de ELISA basado en ASTL al enfrentar ambos test a muestras de pacientes afectados por LCA (casos) e individuos sanos (controles).

2.2.2. Lugar de estudio.

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Patho-Antígenos – LID, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2.2.3. Población de estudio.

La población de estudio se compone de muestras de suero/plasma humano que fueron divididas en tres grupos: (i) muestras “positivas”: obtenidas de pacientes con diagnóstico confirmado de LCA; (ii) muestras “negativas”: obtenidas de individuos aparentemente sanos sin historia clínica para LCA, provenientes de áreas no endémicas para LCA; y (iii) muestras obtenidas de pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad de Chagas.

Para definir el número de muestras **positivas** y **negativas** (población muestral) se empleó el siguiente algoritmo de cálculo (41, 44):

$$n = \left\{ \frac{[(Z_{\alpha})^2 * p * (1-p)]}{d^2} \right\}$$

Donde:

$(Z_{\alpha})^2$: Valor de la distribución Z con un nivel de significancia bilateral $\alpha = 0.05$ (1.960)

p : Estimador estadístico (Proporción esperada)

d : Precisión permitida (Coeficiente de variación permitida)

Para la estimación de la **sensibilidad y especificidad diagnóstica** (SnD y EsD) **primarias** se consideró un nivel de significancia “ α ” de 0.05 bilateral (0.025); asumiendo que las absorbancias relativas (AR) obtenidas tienen una distribución normal (por lo tanto pueden ser inferidos a una distribución Z). Así mismo, se consideró una precisión estadística permitida del 7.1% (poder estadístico del 92.9%) para la SnD y del 8.5% (potencia estadística del 91.5%) para la EsD; ésto debido a la disponibilidad de muestras de plasma en el tiempo establecido para la ejecución del presente estudio. Considerando una sensibilidad esperada del 95% (estimador estadístico muestral) se ensayaron 36 muestras de plasma positivas y tomando en cuenta una especificidad esperada del 90% se ensayaron 47 muestras de suero negativas.

Para la estimación de la **especificidad analítica** (EsA) se ensayaron 10 muestras de suero obtenidas de pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad de Chagas considerando un nivel de significancia “ α ” de 0.05 bilateral; una precisión permitida del 18.5% y un estimador estadístico muestral del 90%.

Para la estimación de la precisión del test de ELISA indirecto basada en la proteína M2N (M2N-ELISA) se ensayaron 17 muestras de plasma positivas considerando un nivel de significancia “ α ” de 0.05 unilateral; una precisión permitida del 12% y un estimador estadístico muestral del 10%.

2.2.4. Muestras de suero/plasma.

Las muestras de plasma de pacientes con diagnóstico confirmado de LCA fueron seleccionadas de la colección de plasma disponible en el marco del proyecto RAPSODI (2009-2012) que fue subvencionado por la Comisión Europea: “Estudios preclínicos de una vacuna humana candidata basada en PSA enfocado en leishmaniosis cutánea, mucocutánea, visceral y desarrollo de los procedimientos asociados para posteriores ensayos clínicos”. La confirmación del diagnóstico de LCA se realizó mediante métodos parasitológicos (cultivo, frotis directo) y moleculares (PCR). Los pacientes fueron enrolados en zonas endémicas de LCA en el Departamento de Cusco, región donde circula principalmente *Leishmania braziliensis*. Se tiene conocimiento que algunos pacientes fueron diagnosticados con LCA causada por *L. braziliensis* (Dra. María Cruz Saldarriaga, Médico Especialista en Enfermedades Infecciosas y Tropicales, Hospital Nacional Adolfo Guevara Velasco – Cusco; comunicación personal); la tipificación de especies de *Leishmania* fue determinada por PCR (gen *mpi*) y PCR-RFLP (genes *cpb* y *hsp70*) (45).

El proyecto RAPSODI contó con aprobación del Comité Institucional de Ética (CIE) para humanos de la UPCH. Para el presente estudio solo se incluyeron las muestras de aquellos pacientes que dieron su autorización para el uso de sus muestras almacenadas mediante la firma de un consentimiento informado.

Las muestras de suero obtenidas de individuos aparentemente sanos, sin historia clínica de LCA ni registro de viajes a zonas endémicas de LCA en Perú, fueron colectadas de donantes adultos voluntarios de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la UPCH, previo consentimiento informado.

Las muestras de suero obtenidas de pacientes con diagnóstico confirmado de enfermedad de Chagas fueron gentilmente donadas por la Dra. Manuela Verástegui, Coordinadora del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas - LID, UPCH.

El protocolo de investigación de este estudio, el re-consentimiento informado (para el uso de las muestras almacenadas del proyecto RAPSODI) y el consentimiento informado (para donantes adultos sanos) fueron aprobados por el CIE de la UPCH [Proyecto 61612] en sesión de fecha 16 de noviembre de 2015 (Anexo N° 01).

2.2.4.1. Colección de muestras de suero negativo.

Se tomaron 47 muestras de 6mL de sangre periférica, las cuales se dejaron reposar durante 15 minutos y luego fueron centrifugadas a 1700 x g por 10 min. El suero fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso.

2.2.5. Procedimientos y técnicas.

2.2.5.1. Producción de proteína multiepitópica.

Se transformaron 60 μ L de células electrocompetentes de la cepa de *E.coli* BL21 [F⁻ *ompT* *hsdSB*(rB⁻ , mB⁻) *gal dcm* (DE3)] con el plásmido *pET28a(+)-M2N* mediante electroporación con las condiciones establecidas en: (i) voltaje: 2.5 kV; (ii) capacitancia: 25 μ F; (iii) resistencia: 200 Ohmios. Se escogió la cepa de *E.coli* BL21 puesto que ésta carece de la enzima aspartil proteasa (*ompT*), por lo tanto no se produce la degradación de proteínas recombinantes expresadas en dicha cepa (46–48).

Las células de *E.coli* BL21 transformadas fueron sembradas por diseminación en placas de agar LB Kanamicina (0.25 μ g/mL) (LBKan) e incubadas a 37°C O/N. Una colonia de *E.coli* BL21 transformada fue transferida a 1 tubo con 10 mL de caldo LBKan e incubado O/N a 37°C a 250 rpm. El pre-inóculo fue vertido a un volumen de 1200 mL de caldo LBKan e incubado a 37°C a 250 rpm hasta alcanzar una DO de 0.3. La expresión de la proteína recombinante M2N fue inducida con 1mM IPTG a 25°C por 22h a 250 rpm. Las condiciones de expresión de proteína M2N fueron optimizadas mediante la metodología de superficie respuesta. Terminada la expresión, el cultivo fue centrifugado a 3000 x g por 20 minutos y las células obtenidas fueron almacenadas a -20°C.

2.2.5.2. Purificación de la proteína multiepitópica.

2.2.5.2.1. Cromatografía de afinidad.

Las células obtenidas de la producción de proteína M2N (*apartado 2.2.5.1*) fueron descongeladas a 4°C y resuspendidas con 4 mL de buffer de lisis desnaturizante (Úrea 8M, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 10 mM) helado. Las células fueron lisadas mediante sonicación (20KHz en 6 ciclos de 10 segundos con intervalos de 10 segundos de reposo).

La suspensión translúcida resultante fue centrifugada a 4700 x g por 20 minutos. A partir de 9 mL de sobrenadante obtenido, se purificó la proteína M2N mediante cromatografía de afinidad, para lo cual se añadió 0.9 mL de resina Ni-NTA agarosa a 4°C (53, 54). Dicha mezcla fue mantenida en agitación O/N a 4°C. Luego, la suspensión con la resina de Ni-NTA agarosa fue vertida en una columna de 5 mL (previamente equilibrada con 4 mL de buffer de lisis desnaturizante). Se dejó fluir la fracción soluble a través de la columna, luego se lavó dos veces la resina con 3 mL de **buffer de lavado desnaturizante** (Úrea 8M, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 50 mM). Finalmente se eluyó la proteína M2N con 4 mL de **buffer desnaturizante de elución** (Úrea 8M, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 300 mM). Se colectaron nueve fracciones de 500 µL de proteína eluida M2N. Las fracciones fueron preservadas inmediatamente a -20°C.

Se procedió a la cuantificación de la cantidad total de proteína (Bradford) durante los pasos de producción y purificación. Luego se realizó el análisis de expresión y de purificación de la proteína M2N mediante electroforesis SDS-PAGE discontinua. Finalmente, se realizó un ensayo de Western blot, empleando el Penta-His HRP Conjugate kit (55).

2.2.5.2.2. Diálisis de la proteína multiepitópica.

Previo a la escisión con trombina de la cola 6*His (*apartado 1.3.5*), la proteína recombinante purificada (*apartado 2.2.5.2.1*) fue dializada en microtubo contra el buffer Tris 50 mM pH 7.5 a 4°C durante 2 horas (56). Luego se cuantificaron las concentraciones de proteína total (Bradford) y de úrea (EPF) (57) con el propósito de calcular la eficiencia del proceso de diálisis expresada por el porcentaje de úrea eliminada.

2.2.5.2.3. Escisión de la cola 6*His de la proteína multiepitópica.

La reacción de escisión se llevó a cabo en buffer Tris 50 mM pH 7.5, empleando 10 U de trombina bovina por mg de proteína, a 37°C durante 48 horas a 250 rpm (58, 59).

Luego, la trombina fue removida al unirse a la resina de benzamidina-agarosa, para lo cual se adicionó 100 µL de resina de a cada fracción de proteína M2N y fue incubada a 4°C O/N con agitación constante (60). Finalizado el tiempo de incubación, la trombina unida a la resina de

benzamidina agarosa fue retenida en columnas de 5 mL al dejar fluir la fracción soluble (proteína M2N y la cola de 6*His escindida) a través de éstas.

Posteriormente, la cola de 6*His (escindida de la proteína M2N) se unió a la resina de Ni-NTA-agarosa mediante incubación a 4°C O/N con agitación constante. Finalmente la cola de 6*His unida a la resina fue retenida en columnas de polipropileno y se dejó fluir la fracción soluble con proteína M2N.

Las fracciones de proteína M2N obtenidas, luego de la eliminación de la trombina y cola de 6*His, fueron cuantificadas (Bradford) y conservadas a -20°C.

2.2.5.3. Optimización de un test de ELISA indirecto basado en la proteína M2N.

En la optimización del test de ELISA indirecto se exploraron las mejores condiciones de variables tales como el tipo de buffer de bloqueo [leche descremada BSA, caseína, leche en polvo comercial], concentración óptima de antígeno, dilución óptima de anticuerpo primario (muestras suero positiva y negativa), dilución óptima de anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado a peroxidasa de rabanita - HRP). Se emplearon dos protocolos de ELISA indirecto durante el proceso de optimización (Anexos N° 02 y 03) (41).

Los resultados de los ensayos de ELISA se presentaron empleando la **Absorbancia Relativa (AR)**; ésta establece la relación entre la

absorbancia (DO) resultante del análisis de una muestra de suero/plasma en un test de ELISA y la absorbancia obtenida del mismo análisis con el mismo test sin emplear el antígeno (M2N y ASTL). Con este resultado se obtiene una perspectiva de la intensidad de unión de los anticuerpos (presentes en las muestras de suero/plasma) al antígeno en comparación a la intensidad de unión a la proteína de bloqueo.

$$AR = \frac{(Abs/M/Ag)}{(Abs/M/NoAg)}$$

Donde:

AR: absorbancia relativa

(AbS/M/Ag): Sistema de análisis de ELISA conformado por Anticuerpo secundario conjugado (AbS); Muestra a analizar (M) y Antígeno (Ag).

(AbS/M/NoAg): Sistema de control de análisis de ELISA conformado por Anticuerpo secundario conjugado (AbS); Muestra a analizar (M) y SIN Antígeno (NoAg).

Esta forma de presentación de resultados (junto a los porcentajes de positividad) usualmente son empleados para los ensayos de ELISA. Fue elegida porque la unión de los anticuerpos del suero/plasma a la proteína de bloqueo es de carácter aleatorio y variable entre muestras de pacientes (tomando en cuenta que las muestras de suero/plasma de pacientes incluyen una mezcla mixta de anticuerpos para varias dianas). Esta variabilidad (si fuera reportada directamente como DO) podría originar errores en el análisis de muestras de suero/plasma (formación de falsos

negativos o falsos positivos en comparación con controles positivos, controles negativos o entre las mismas muestras).

Durante la optimización se añadieron 3 controles a cada placa de ELISA detallados a continuación:

- (i) **Control de unión inespecífica de anticuerpos del suero o plasma (ya sea negativo o positivo) a la proteína de bloqueo (AbS/M/NoAg):** En cada placa de ELISA se ensayaron pozos en los cuales no se adsorbió el antígeno; sin embargo, se añadió la dilución de muestra de suero/plasma y luego el anticuerpo secundario anti IgG-HRP. Este control sirve para explorar la inespecificidad de unión de los anticuerpos de la muestra de suero/plasma a la proteína de bloqueo. Si la DO (absorbancia) de la unión inespecífica es muy alta, entonces la proteína de bloqueo no es la adecuada. A la vez, sirve para el cálculo de la **absorbancia relativa (AR)**.
- (ii) **Control de unión inespecífica del anticuerpo secundario al antígeno (AbS/NoM/Ag):** En cada placa de ELISA se ensayaron pozos en los cuales se adsorbió el antígeno; sin embargo, no se añadió la dilución de muestra de suero/plasma, aunque sí se añadió el anticuerpo secundario anti IgG-HRP. Este control sirve para observar el nivel de unión inespecífica del anticuerpo secundario a la proteína empleada como antígeno.
- (iii) **Control de unión inespecífica del anticuerpo secundario a la proteína de bloqueo (AbS/NoM/NoAg):** En cada placa de ELISA

se ensayaron pozos en los cuales no se adsorbió el antígeno y no se añadió la dilución de muestra de suero/plasma; sin embargo, sí se añadió el anticuerpo secundario anti IgG-HRP. Este control sirve para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo secundario a la proteína de bloqueo.

2.2.5.3.1. Optimización con protocolo de ELISA N° 01.

El proceso de optimización se inició con la selección del buffer de *coating* adecuado. Para ello se realizó un ensayo de ELISA indirecto empleando una dilución 1:200 de una muestra de plasma positivo y una dilución 1:2000 de anti-IgG conjugado a HRP. La proteína M2N fue probada en distintas concentraciones seriadas desde 2 µg/mL hasta 1 µg/mL y disueltas en los siguientes buffers de *coating*: (i) MPBS 1% (leche descremada al 1% disuelta en buffer PBS); (ii) buffer Carbonato/Bicarbonato 0.05 M pH 9.6; (iii) MPBS 1%/Úrea 4M; (iv) Buffer Carbonato-Bicarbonato/Úrea 4M; y (v) Úrea 8M.

Luego se procedió con la exploración de la concentración óptima de antígeno (M2N) y dilución óptima de anticuerpo secundario (AbS). Se probaron concentraciones seriadas de la proteína M2N desde 16 µg/mL hasta 0.0316 µg/mL y diluciones seriadas de AbS desde 1:2500 hasta 1:20000. Se emplearon dos muestras positivas de plasma y cuatro sueros negativos.

Además, añadiendo los controles detallados en el *apartado 2.2.5.3*, se efectuaron 6 ensayos de ELISA en la búsqueda de las condiciones

óptimas de antígeno y anticuerpo secundario. Luego, se exploraron tres proteínas de bloqueo, a distintas concentraciones, empleando los buffers MPBS (al 4%, 3%, 2% y 1%); BSA (al 4%, 3%, 2%, 1%) y Caseína (al 1% y 0.5 %).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos de tales ensayos (*apartado 3.2*, Tabla N° 06 – filas 1 al 9) se decidió sustituir todas las condiciones empleadas en el Protocolo de ELISA N° 1 (Anexo N° 02). Esto con la finalidad de favorecer que los anticuerpos del suero/plasma se unan con más fuerza a la proteína M2N en desmedro de la proteína de bloqueo; por lo tanto se dispuso: (i) Aumentar la concentración de proteína M2N. (ii) Extender los tiempos de incubación. (iii) Emplear la temperatura de 37°C en los pasos de incubación con la muestra de suero/plasma y el anticuerpo secundario, tomando en cuenta que los anticuerpos desempeñan su función de manera natural a temperatura fisiológica. (iv) Agitar la placa de ELISA a un ritmo de 300 rpm para que los anticuerpos obtengan la energía cinética necesaria para favorecer las uniones electrostáticas con la proteína M2N. Tales nuevas condiciones de ensayo se denominaron como **Protocolo de ELISA N° 02** (Anexo N° 03).

2.2.5.3.2. Optimización con protocolo de ELISA N° 02.

Se evaluaron 2 muestras de plasma positivo y 3 muestras de suero negativo (*apartado 3.2*, Tabla N° 06 – fila 10). Al continuar los inconvenientes con respecto a la proteína de bloqueo, se decidió

cambiar de leche descremada (skim milk powder, *apartado 2.1.1*) a leche en polvo comercial al 5% disuelto en buffer PBS y se repitió el ensayo de ELISA con las muestras antes mencionadas añadiendo otras 4 muestras negativas (*apartado 3.2*, Tabla N° 06 – fila 11).

Para determinar la dilución de suero/plasma y la concentración de antígeno más adecuadas para las condiciones ensayadas se exploraron diluciones seriadas (desde 1:25 hasta 1:800) de una muestra de plasma positivo y otra de suero negativo frente a diluciones seriadas de M2N y ASTL (ambos desde una concentración de 50 µg/mL a 2 µg/mL) (*apartado 3.2*, Tabla N° 06 – filas 12, 13, 14). Seguidamente se ensayaron diluciones seriadas de una muestra de plasma positivo y otra de suero negativo (desde 1:25 hasta 1:800) frente a los antígenos M2N y ASTL para estimar la dilución óptima de muestra de suero/plasma (*apartado 3.2*, Tabla N° 06 – filas 15, 16, 17).

Finalmente se ensayaron otras 6 muestras positivas realizando diluciones seriadas (desde 1:25 hasta 1:800) de una muestra de plasma positivo en comparación con un suero negativo empleando los dos antígenos M2N y ASTL en dilución seriada desde una concentración de 50 µg/mL hasta 2 µg/mL (*apartado 3.2*, Tabla N° 06 – filas 18, 19, 20). Este ensayo fue repetido dos veces con el propósito de comprobar la repetitividad en los resultados obtenidos, con lo cual quedaron establecidas las condiciones más óptimas para el ensayo de ELISA indirecto basado en la proteína multiepitópica M2N (Protocolo optimizado ELISA N° 03 - Anexo N° 04).

2.2.5.4. Validación analítica de un test de ELISA indirecto basado en la proteína M2N.

Se procedió a validar analíticamente el test de ELISA indirecto basado en la proteína M2N (M2N–ELISA). Esta validación se enfocó en la evaluación del test para proveer resultados (en términos de absorbancia relativa – AR o porcentaje de positividad - PP) que: (i) puedan identificar consistentemente como positiva a una muestra de suero/plasma por la presencia de anticuerpos que se unen específicamente a la proteína M2N; (ii) puedan distinguir como negativo a una muestra de suero que carece de anticuerpos específicos para *Leishmania*; y (iii) puedan revelar, por predicción inferencial, la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para *Leishmania sp* (enfocado en *L. braziliensis*) a un nivel conocido de certeza estadística (41).

2.2.5.4.1. Umbral positivo/negativo y Sensibilidad/Especificidad diagnóstica primaria.

La validación analítica se inició estableciendo un **punto de corte – cut-off o umbral positivo/negativo** definido como el nivel de actividad de anticuerpo el cual determina el estado reactivo de positivo o negativo para una muestra de suero/plasma de un individuo dado (41, 61, 62). Para lo cual, se analizaron 36 muestras de plasma de pacientes con diagnóstico confirmado de LCA y 47 muestras de suero de individuos aparentemente sanos sin historia clínica de LCA (*apartado 2.2.4*)

empleando como antígenos a la proteína M2N (25 µg/mL) y al ASTL (25 µg/mL).

Cada placa de ELISA empleada para el análisis estuvo comprendida por: (i) las muestra de pacientes con diagnóstico de LCA y controles sanos por triplicado; (ii) los controles **AbS/M/NoAg**, **AbS/NoM/Ag**, **AbS/NoM/NoAg**; (iii) una muestra positiva Rap43 y una negativa CN/LC-01 (para el ensayo de precisión analítica); (iv) un patrón positivo (que consistió en una mezcla de 6 muestras positivas en dilución 1:10 analizado por triplicado, *apartado 2.2.5.4.3*).

La determinación del cut-off se realizó tomando en cuenta la distribución de las absorbancias relativas resultantes del análisis de las 47 muestras de suero negativas; por lo tanto, se calculó el promedio de todas las absorbancias relativas a las que se sumó dos veces el valor de la desviación estándar (+2*SD) (33, 62).

Con el *cut-off* definido y las muestras de plasma positivas y negativas analizadas, se procedió a calcular los valores de sensibilidad diagnóstica primaria – SnD' (definida como la proporción de casos positivos detectados como tales por el test analítico) y especificidad diagnóstica primaria – EsD' (definida como la proporción de casos negativos distinguidos como tales por el test analítico). Para ello se emplearon las siguientes fórmulas:

$$\text{SnD}' = \mathbf{a}' / (\mathbf{a}' + \mathbf{c}') \quad \wedge \quad \text{EsD}' = \mathbf{d}' / (\mathbf{d}' + \mathbf{b}')$$

Donde:

a' : Verdaderos positivos (VP)

b' : Falsos positivos (FP)

c' : Falsos negativos (FN)

d' : Verdaderos negativos (VN)

2.2.5.4.2. Especificidad analítica.

La especificidad analítica está definida como la capacidad del test analítico de distinguir y detectar únicamente anticuerpos anti-*Leishmania* (enfocado en *L. braziliensis*) en comparación con otros anticuerpos para otras infecciones (33, 63). Para ello, 10 muestras de suero provenientes de pacientes con diagnóstico confirmado para la enfermedad de Chagas fueron analizadas empleando como antígenos a la proteína M2N (25 µg/mL) y al ASTL (25 µg/mL). Cada placa de ELISA estuvo comprendida por: (i) una muestra de suero de paciente chagásico (analizada desde una dilución 1:50 hasta 1:1600); (ii) los controles AbS/M/NoAg, AbS/NoM/Ag, AbS/NoM/NoAg; (iii) una muestra LCA positiva Rap43 y una negativa CN/LC-01 (para el ensayo de precisión analítica).

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado para la dilución 1:200 y por duplicado para las demás diluciones. Los resultados fueron cotejados con el *Cut-off* positivo/negativo anteriormente calculado

(*apartado 3.3.1*) para definir el grado de reactividad cruzada del test de ELISA para la enfermedad de Chagas.

Por otra parte, las 36 muestras de plasma positivas para LCA fueron analizadas, mediante la técnica TESA-Blot (64, 65), para el descarte de la enfermedad de Chagas por el Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas-LID de la UPCH.

2.2.5.4.3. Capacidad predictiva diagnóstica.

La capacidad predictiva diagnóstica del test M2N–ELISA fue estimada empleando un **modelo de regresión logística binaria** (66). Para lo cual, se calcularon los porcentajes de positividad (PP) a partir de las absorbancias relativas de cada muestra de suero/plasma según la siguiente ecuación:

$$PP = \left(\frac{AR - \text{muestra de suero}}{AR - \text{patrón positivo}} \right) \times 100\%$$

El “patrón positivo” empleado en el cálculo de los *PPs* fue elaborado de la mezcla de 6 muestras “positivas” (mix control positivo) el cual fue puesto en cada placa de ELISA empleada en el análisis de las muestras positiva y negativa, por triplicado en una dilución 1:10. Se dispuso del paquete estadístico STATA v14.0 (StataCorp 2015) para efectuar el análisis de **regresión logística binaria** (66).

2.2.5.4.4. Precisión analítica.

La precisión analítica del test de ELISA está definida como el grado de reproducibilidad de un método analítico bajo condiciones de ensayo estándar (optimizadas). Las dimensiones de la precisión tomadas en cuenta fueron: (i) **la precisión intra-ensayo** o reproducibilidad y (ii) **la precisión intermedia o repetitividad** (inter-placas e inter-diario) (63).

Para la **precisión intra-ensayo**, 1 muestra positiva fue analizada 17 veces en una misma placa de ELISA. A cada placa de ELISA empleada en cada ensayo de precisión se le añadió los controles respectivos AbS/M/NoAg, AbS/NoM/Ag, Abs/NoM/NoAg y una muestra negativa como control negativo.

Para la **precisión inter-placas**, 17 muestras de plasma positivas fueron analizadas por duplicado tres veces el mismo día (empleando 3 placas de ELISA).

Para la **precisión inter-diario**, las mismas 17 muestras de plasma positivas fueron analizadas en una misma placa de ELISA por duplicado en tres distintos días (un día por cada placa). Seguidamente, dos muestras, una positiva y una negativa, fueron analizadas 17 veces en 17 placas durante 17 días (1 placa por vez por día).

Los promedios de **absorbancia relativa** obtenidos en cada ensayo de precisión fueron analizados para calcular el coeficiente de variación (CV%); el cual es un estadístico adimensional que refleja la relación entre la dispersión y la media aritmética de una variable de razón.

2.2.6. Análisis Estadístico:

El análisis estadístico fue empleado para el análisis de los datos obtenidos en la validación analítica del test M2N–ELISA.

Para el proceso de validación analítica se emplearon los paquetes estadísticos IBM SPSS Statistics v. 20.0 (IBM 2012) y STATA versión 14.0 (StataCorp 2015). Se realizó un test de normalidad (estadístico de Kolmogorov-Smirnov) de los resultados (absorbancias relativas) de los ensayos de ELISA (sensibilidad, especificidad, reactividad cruzada, precisión) para luego realizar operaciones de estadística descriptiva (gráficas de puntos, intervalos de confianza, coeficiente de variación).

Se estimó la capacidad predictiva diagnóstica de los test de ELISA indirecto M2N–ELISA y ASTL–ELISA empleando un modelo de regresión logística binaria (66). Ésta se basa en una ecuación logística (*ecuación 1*) que ajusta la probabilidad de ocurrencia de un evento en términos de un estimador estadístico binario (positivo, negativo) para valorar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos enfocados en *L. braziliensis* en muestras de suero/plasma humano.

$$y = \left[\frac{1}{1 + e^{-f(x_i)}} \right] \dots \dots (1)$$

Donde:

- ✓ y = probabilidad binomial de la ocurrencia de un evento en términos de una función predictora (prueba diagnóstica para una enfermedad).
- ✓ e = número de euler (*o constante natural*) aproximado a 2.718281828
- ✓ $f(x_i)$ = función predictora en términos de las variables “ $x_1 \rightarrow x_i$ ” = $b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_ix_i$
 x_i = variables predictoras de ocurrencia de evento (p.e. resultado de una prueba de diagnóstico)

Es necesario linealizar la *ecuación (1)* para poder realizar la regresión lineal; por lo tanto, la *ecuación (1)* se transforma en la *ecuación (2)*.

$$\text{logit}(p_1) = \text{Ln} \left(\frac{p_1}{1-p_1} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 \dots \dots (2)$$

Donde:

- ✓ p_1 = probabilidad binomial de la ocurrencia del estatus diagnóstico (positivo o negativo) de leishmaniosis cutánea (LC) en función de una variable predictora " x_1 "
- ✓ x_1 = variable predictora del estatus diagnóstico de LCA (porcentaje de positividad - PP de un suero ensayado)
- ✓ $b_0; b_1$ = parámetros no conocidos de la función lineal predictora en términos de PP
- ✓ $(p_1) / (1 - p_1)$ = odds-ratio para la probabilidad binomial " p_1 ". Razón de la probabilidad de ocurrencia de un evento (*positivo*) frente a la probabilidad de ausencia del evento (*negativo*).

La *ecuación (2)* relaciona dos funciones, una denominada como **función categórica binaria Logit (P)** y otra **función ordinal lineal** denominada predictiva - $f(x_1)$. La función **Logit (P)** señala la razón de probabilidad (**Odds-ratio**) de ocurrencia de un evento (positividad de muestras de plasma) frente a la ausencia de un evento (negatividad de muestras de suero). En una población muestral de 83 sueros/plasma, se conocen todas los posibles valores del **Odds-ratio**, puesto que el estatus infeccioso todas las muestras de suero han sido precisados (36 muestras de plasma diagnosticados para LCA y 43 sin historial clínico para LCA). Conociendo los valores de **Odds-ratio**, es posible estimar si se pueden obtener los mismos valores comparando la positividad o negatividad de las muestras de suero/plasma con la capacidad de identificar la presencia

o ausencia de anticuerpos enfocados en *L. braziliensis* valorados por el test M2N–ELISA [$f(x_1)$]. Este procedimiento estadístico es denominado **regresión logística binaria (RLB)**.

La RLB fue realizada por el paquete estadístico STATA versión 14.0 (StataCorp 2015), el cual estimó: (i) el pseudo-coeficiente de correlación lineal (R^2); (ii) los parámetros b_0 , b_1 , mediante el método de máxima verosimilitud; (iii) la significancia de los parámetros b_0 , b_1 , juntos y por separado; (iv) la sensibilidad y especificidad diagnóstica primarias del modelo predictivo; (v) la significancia del modelo predictivo mediante la bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow.

Luego se buscó los valores de sensibilidad y especificidad más altos y destacados para M2N–ELISA y ASTL–ELISA, para lo cual se estimaron los puntos de corte en términos de porcentaje de positividad (**pp cut-off**) adecuados para cada test de serodiagnóstico mediante la búsqueda del más alto valor del **índice de Youden (IY)**. El índice de Youden muestra cuanto menos es específica ($1 - Es$) el test por unidad de sensibilidad (S_n) alcanzada (67):

$$IY = S_n (1 - Es)$$

Donde:

- ✓ **IY** = Índice de Youden
- ✓ **S_n** = Sensibilidad
- ✓ **Es** = Especificidad
- ✓ **1 – Es** = valor predictivo negativo (VPN)

Por lo tanto, un valor elevado de IY revela que un test es muy sensible aunque con un VPN muy bajo; o por el contrario refleja que un test es poco sensible frente a un VPN elevado. Una vez obtenido el pp cut-off mediante la selección del IY más destacado, se estimaron las Sn y Es más relevantes y se elaboraron **curvas ROC** (característica operativa del receptor) estimando las áreas bajo la curva ROC para M2N-ELISA y ASTL-ELISA.

Finalmente, se realizaron gráficas de Levey-Jennings (68) de las absorbancias relativas (AR) y de los coeficientes de variación (CV%) de los ensayos de precisión para evaluar la dispersión de los datos y establecer la calidad analítica del test M2N-ELISA.

Las gráficas de Levey-Jennings se emplean para la validación y el control de calidad de técnicas analíticas; se presentan los datos de un proceso analítico (varias mediciones analíticas de una misma muestra) y la dispersión que éstos alcanzan a través de una, dos o tres desviaciones estándar (SD). Para el análisis de las gráficas de Levey-Jennings, frecuentemente se toman en cuenta las reglas de control de técnicas analíticas de Westgard (68):

- Una técnica analítica está dentro de control si cumple dos de las tres premisas: (i) 68% de todos los valores (absorbancias relativas/coeficientes de variación) caen dentro de $\pm 1SD$; (ii) 95,5% de todos los valores caen dentro de $\pm 2SD$, (iii) 99,7% de todos los valores caen dentro de $\pm 3SD$

- Una técnica analítica presenta **errores aleatorios o sistemáticos** si:
 - (i) Un valor cae fuera de $\pm 3SD$ identifica un error aleatorio o el inicio de un error sistemático, el valor es rechazado;
 - (ii) Dos de tres últimos valores caen fuera de $\pm 2SD$ identifican un error sistemático abrupto;
 - (iii) Cuatro de los cinco últimos caen fuera de $\pm 1SD$ identifican el inicio de un error sistemático en tendencia;
 - (iv) Ocho puntos por encima o debajo de la línea central (media aritmética) identifican un error sistemático en tendencia;
 - (v) Seis puntos en una fila con tendencia ascendente o descendente identifican un error sistemático en tendencia,
 - (vi) 14 puntos en una fila alternante identifican la pérdida la confianza de la técnica analítica.

Los **errores aleatorios** son desviaciones puntuales repentinas respecto a un resultado esperado. Por lo general estos valores son rechazados y no son reportados si caen fuera de $\pm 3SD$; o pueden ser reportados si caen fuera de $\pm 2SD$, aunque el resultado es una advertencia de error aleatorio o sistemático futuro.

En cambio, Los **errores sistemáticos** pueden darse por un cambio no reportado en la media de los valores de control (en el caso del control de una técnica analítica de rutina). Así mismo, los **errores sistemáticos** se pueden identificar por la dispersión en **tendencia** (cambio gradual) o como **desplazamiento** (cambio abrupto) alrededor de la media de los valores obtenidos durante el proceso analítico. Valores obtenidos en forma de **tendencia** señalan la pérdida de confianza de la técnica analítica; esta puede deberse a: (i) deterioro de la fuente de luz del

instrumento, (ii) acumulación gradual o casual de contaminantes en los recipientes de muestra (placas de ELISA), (iv) caducidad o envejecimiento de reactivos, (v) deterioros graduales en temperaturas y tiempos de incubación. Por otra parte el **desplazamiento abrupto** de los valores obtenidos pueden deberse a: (i) falla o cambio repentino en la fuente de luz del instrumento, (ii) cambio en la formulación de soluciones buffer o reactivos, (iv) fallas en la carga de muestras, controles o reactivos, (v) fallas en el sistema de muestreo o en el almacenamiento de muestras (v) falta o errores de calibración de instrumentos analíticos.

III. RESULTADOS

3.1. Producción y purificación de la proteína M2N.

La Tabla N° 05 resume la producción y el proceso de purificación de la proteína recombinante M2N. Se observa que el porcentaje de eliminación de úrea es del 93.68%. Además se puede apreciar que la eficacia de escisión de la cola 6*His con trombina, junto con el proceso de eliminación del subproducto (cola de 6*His y proteína M2N no reaccionante), se engloba alrededor de un 78.31%. Dicho resultado indica que el 21.69% de proteína restante estaría compuesta por proteína M2N que no tiene la cola 6*His escindida.

Tabla N° 05: Purificación de la proteína multiepitópica M2N.

Etapa de Purificación	Volumen (mL)	Proteína total (µg/mL)	Proteína total (µg)
Lisado celular CI	9.50	17354.00	164863.00 ^b
Ni-NTA-Agarosa	4.00	2740.50	10962.00
Diálisis	2.77	3707.10	10268.70
Escisión de la cola 6*His ^a	14.72	546.17	8041.29
Eficacia de purificación	4.88 % ^b	6.7 mg/L ^c	
Eficacia de diálisis ^d	93.68 %		
Eficacia de escisión de la cola 6*His ^a	78.31 %		

a: Incluye la eliminación de la trombina, del 6*His tag y M2N-6*His-tag. **b:** La eficacia de la purificación esta reflejada por el porcentaje de proteína M2N purificada con respecto a la proteína total obtenida luego de la producción. **c:** tomando en cuenta la cantidad de proteína M2N purificada con respecto al volumen de cultivo empleado para su producción. **d:** La eficacia de la diálisis esta reflejada por el porcentaje de úrea eliminada luego del proceso desalinizador.

Finalmente, la eficacia de purificación de la proteína recombinante M2N es de: (i) alrededor del 4.88% (tomando en cuenta la cantidad de proteína M2N purificada con respecto al total obtenido luego de la producción), (ii) de 6.70 mg de proteína/L de cultivo celular (tomando en cuenta la cantidad de proteína M2N purificada con respecto al volumen de cultivo empleado para su producción), o (iii) de 73.24% (tomando en cuenta la cantidad de proteína M2N purificada con respecto al total de proteína obtenido durante el primer paso de purificación).

3.2. Optimización del test de ELISA indirecto basado en la proteína recombinante M2N.

La Tabla N° 06 resume los ensayos exploratorios realizados durante la optimización del test M2N–ELISA:

Tabla N° 06. Proceso de optimización del test M2N–ELISA. Parte I

# ELISA	Antígeno	Muestra	Abs	Coating	Bloqueo	Protocolo	Obs/Resultado
1	M2N (2 a 0.1 µg/mL)	Pos Rap560 (1 en 200) en MPBS 1 %	1 en 2000 en MPBS 1%	MPBS 1%; Buffer Carbonato/Bicarbonato pH 9.6; MPBS 1%/Úrea 4M; Buffer Carbonato-Bicarbonato/Úrea 4M y Úrea 8M	MPBS 1%	ELISA 1	Mejor coating con Buffer Carbonato-Bicarbonato
2	M2N (16 a 0.03125 µg /mL)	Pos Rap560 (1 en 200) y Neg Rap170 (1 en 400) en MPBS 1 %	1:2500 a 1:20000 en MPBS 1%	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 1%	ELISA 1	Óptimo hasta 2 µg /mL de M2N y 1 en 20000 de Abs
3	M2N (2 y 4 µg /mL)	Pos Rap560 (1:50 a 1:25600) y Neg Rap170 (1:50 a 1:25600) en MPBS 1 %	1:20000 en MPBS 1%	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 1%	ELISA 1	Sin marcada diferencia entre “pos” y “neg” en las diluciones 1:400 y 1:800
4	M2N (16 a 0.03125 µg /mL)	Neg CN/LC-05 (1 en 400) en MPBS 2 %	1:2500 a 1:20000 en MPBS 2%	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 2%	ELISA 1	Adición de controles AbS/M/NoAg AbS/NoM/Ag Abs/NoM/NoAg
5	M2N (16 a 0.03125 µg /mL)	Neg CN/LC-05 (1 en 400) en MPBS 2 %	1:2500 a 1:20000 en MPBS 2%	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 2%	ELISA 1	DO elevada (falso positivo) Control AbS/M/NoAg elevado
6	M2N (16 a 0.03125 µg /mL)	Pos Rap560 (1 en 200) en MPBS 2 %	1:2500 a 1:20000 en MPBS 2%	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 2%	ELISA 1	Control AbS/M/NoAg elevado
7	M2N (16 a 0.03125 µg /mL)	Pos Rap560 (1 en 200) y Neg CN/LC-05 (1 en 400) en MPBS 2, 3, 4 % y BSA3%	1:2500 a 1:20000 en MPBS 2, 3, 4 % y BSA3%	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 2, 3, 4 % y BSA3%	ELISA 1	Control AbS/M/NoAg elevado dependiente de concentración de MPBS
8	-----	Pos Rap560 (1 en 200) y Neg CN/LC-05 (1 en 400)	1:5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS (0.5 al 3%); BSA (4 al 1%) y Caseína al 1% y 0,5%	ELISA 1	Control AbS/M/NoAg elevado dependiente de concentración de MPBS.

Tabla N° 06. Proceso de optimización del test M2N–ELISA. Parte II

# ELISA	Antígeno	Muestra	AbS	Coating	Bloqueo	Protocolo	Obs/Resultado
9	M2N (16 a 0.03125 µg /mL)	Positivo (560) y Neg CN/LC (01; 05); Rap172; 144; 170)	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS al 1% y BSA 1%	ELISA 1	Resultados no concluyentes. Rap560 “falso negativo”
10	M2N (50 µg /mL)	Positivos Rap (560 y 40) y Negativos Rap (144; 170), CN/LC- 05)	1 en 2000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	BSA 3%	ELISA 2	Control AbS/M/NoAg elevado
11	M2N (50 µg /mL)	Positivos Rap (560 y 42) y Neg CN/LC (01, 02, 05, 15). Dilución de 1:25 a 1:800	1 en 2000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Diferencia entre pos y neg a partir de la dilución 1:200 de muestras
12	M2N (de 50 a 2 µg /mL)	Positivo (Rap42) y Negativos (CN/LC-01). Dilución de 1:100 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Resultados óptimos desde 50 a 12.5 µg /mL de M2N y a partir de 1:200 de dilución de muestra
13	M2N (de 50 a 2 µg /µL)	Positivo (Rap42) y Negativos (CN/LC-01). Dilución de 1:100 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Resultados óptimos desde 50 a 12.5 µg /mL de M2N y a partir de 1:200 de dilución de muestra
14	M2N (de 50 a 2 µg /mL)	Positivo (Rap42) y Negativos (CN/LC-01). Dilución de 1:100 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Resultados óptimos desde 50 a 12.5 µg /mL de M2N y a partir de 1:200 de dilución de muestra
15	M2N (50 µg /mL); ASTL (50 y 10 µg /mL);	Positivo (Rap42) y Negativos (CN/LC-01). Dilución de 1:200 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Buena diferencia de AR entre pos y neg a partir entre dilución 1:200 a 1:400. Resultados similares entre M2N y AST-F
16	M2N (50 µg /mL); ASTL (50 y 10 µg /mL);	Positivo (Rap42) y Negativos (CN/LC-01). Dilución de 1:200 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Buena diferencia de AR entre pos y neg a partir entre dilución 1:200 a 1:400. Resultados similares entre M2N y AST-F

Tabla N° 06. Proceso de optimización del test M2N–ELISA. Parte III

# ELISA	Antígeno	Muestra	AbS	Coating	Bloqueo	Protocolo	Obs/Resultado
17	M2N (50 µg /mL); ASTL (50 y 10 µg /mL)	Positivo (Rap42) y Negativos (CN/LC-01). Dilución de 1:200 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Buena diferencia de AR entre pos y neg a partir entre dilución 1:200 a 1:400. Resultados similares entre M2N y AST-F
18	M2N (50 y 12.5 µg /mL); ASTL (50 y 12.5 µg /mL)	Positivos Rap (31, 05, 201, 128, 43, 146) Dilución de 1:200 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Buena diferencia de AR entre pos y neg a partir entre dilución 1:200 a 1:400. Mejores resultados con M2N que con AST-J
19	M2N (25 µg /mL); ASTL (25 µg /mL)	Positivo (Rap42) y Negativo (CN/LC-01). Dilución de 1:200 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Mejor diferencia de AR entre pos y neg con la dilución 1:200. Resultados similares entre M2N y AST-F.
20	M2N (25 µg /mL); ASTL (25 µg /mL)	Positivo (Rap) y Negativos (CN/LC-01). Dilución de 1:200 a 1:800	1 en 5000	Carbonato/Bicarbonato pH 9.6	MPBS 5% con leche comercial	ELISA 2	Mejor diferencia de AR entre pos y neg con la dilución 1:200. Resultados similares entre M2N y AST-F.

Las filas ELISA del 2 al 6, en la Tabla N° 06, presentan la exploración de la concentración óptima de antígeno (M2N) con diluciones de AbS (Anti IgG–HRP) desde 1:2500 hasta 1:20000 y una dilución constante de 1:200 para las muestras probadas. El ensayo de ELISA 2 indica que se consiguieron resultados favorables con las muestras Rap560 (positivo) y Rap176 (negativo); los cuales se pueden observar en la Figura N° 07.

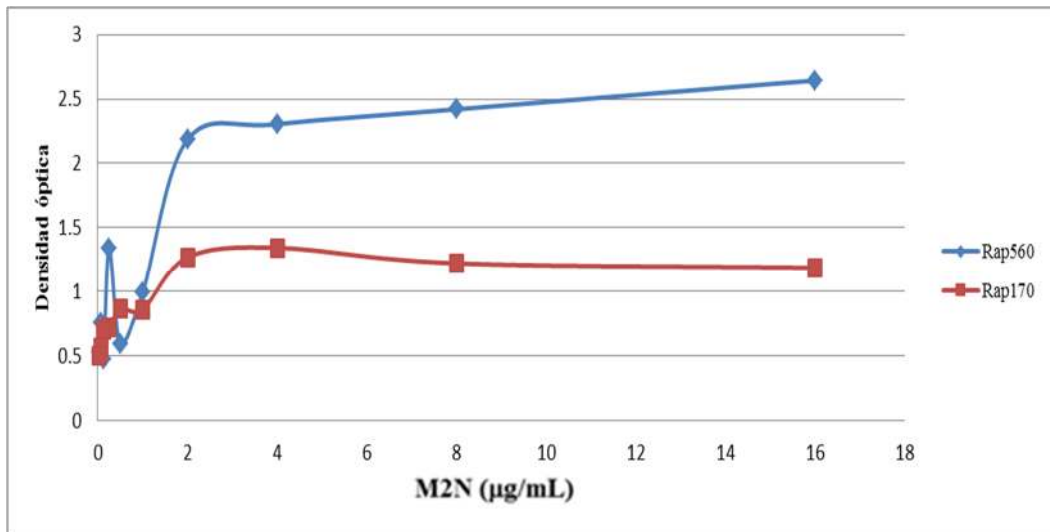


Figura N° 07. DO de la muestra positiva frente a la DO de la muestra negativa.

Curva Azul: Dilución 1 en 200 de la muestra positiva *Rap560* y dilución 1:5000 de anticuerpo secundario. **Curva Roja:** Dilución 1 en 200 de la muestra negativa *Rap170* y dilución 1:5000 de anticuerpo secundario

Sin embargo, al añadir los controles *AbS/M/NoAg*; *AbS/NoM/Ag* y *AbS/NoM/NoAg*, a partir del ensayo de ELISA 4 (Tabla N° 06), se pudo observar que los anticuerpos de las muestras de suero/plasma se unían inespecíficamente en una alta proporción a las proteínas de la leche para bloqueo. Los ensayos de ELISA 08 y 09 (Tabla N° 06) describen el comportamiento de los anticuerpos de muestras positivas y negativas frente a las proteínas de la leche, BSA y caseína, a distintos porcentajes. El ensayo ELISA 08 (Tabla N° 06) muestra que la unión inespecífica de los anticuerpos de las muestras se acentúa con el incremento del porcentaje de leche descremada (skim milk powder) empleada para preparar el buffer MPBS; tales resultados se observan en detalle en la Figura N° 08.

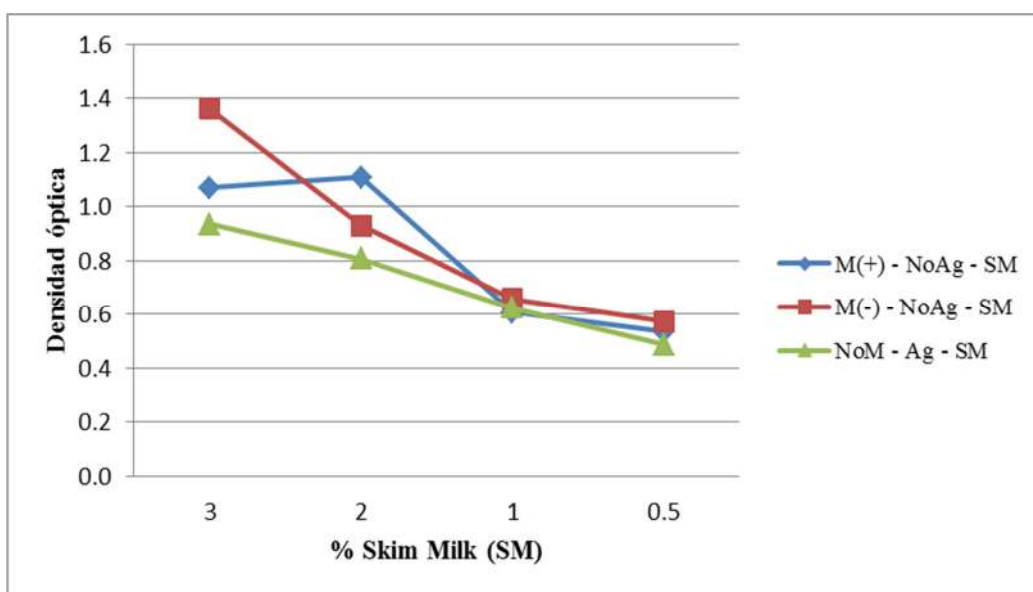


Figura N° 08. Unión inespecífica de anticuerpos de muestras de suero/plasma frente al incremento del porcentaje de SM del buffer de bloqueo MPBS.

SM: leche descremada. **Ag:** Antígeno (proteína M2N). **Curva celeste:** Muestra positiva sin antígeno.

Curva roja: Muestra negativa sin antígeno. **Curva verde:** Muestra positiva frente a antígeno

El ensayo de ELISA 9 (Tabla N° 06) describe la evaluación de más muestras de suero negativo empleando otros bloqueadores como albúmina de suero bovino – BSA (desde 4% al 1% disuelto en buffer PBS) y buffer MPBS (desde 3% al 0.5%). Se obtuvieron resultados similares al ensayo de ELISA 8 (Tabla N° 06).

En vista de los resultados obtenidos, se optó por cambiar de protocolo de ELISA N° 1 por el protocolo de ELISA N° 2 (por los motivos descritos en *apartado 2.2.5.3.1*); en el cual la concentración de antígeno se incrementó a 50 µg/mL, así como los tiempos y temperatura de incubación se incrementaron a 3 horas y 37°C respectivamente con agitación constante (protocolo ELISA N° 02 en el Anexo N° 03).

El ensayo de ELISA 10 (Tabla N° 06) mostró que el uso del protocolo de ELISA N° 2 mejoró ligeramente la diferencia entre las AR de dos muestras positivas (Rap560 y Rap40) comparado con dos muestras negativas (Rap176 y CN/LC-05). Aun así, se obtuvieron altos niveles de anticuerpos unidos inespecíficamente a la proteína de bloqueo empleada (BSA 3%) (ELISA 10 – Tabla N° 06).

El ensayo de ELISA 11 (Tabla N° 06) evidenció que el cambio más importante se dio cuando se usó como proteína de bloqueo a las proteínas de la leche comercial en polvo al 5% disuelta en buffer PBS (MPBS 5%).

La exploración de las diluciones óptimas de antígeno (M2N) y muestras de suero/plasma (ensayo de ELISA 12 - Tabla N° 06) evidenciaron una buena diferencia entre las AR de una muestra positiva (Rap42) comparado con una muestra negativa (CN/LC - 01), empleando al buffer de bloqueo MPBS 5%. Los resultados obtenidos (Figuras N° 09, 10 y Tablas N° 07, 08) exhiben que los niveles de AR mantienen una meseta desde la concentración de proteína M2N de 50 µg/mL hasta 12.5 µg/mL. Por otra parte, las mejores AR se observaron desde la dilución 1:200 hasta 1:800. Los ensayos de ELISA 13, 14 (Tabla N° 06) fueron repeticiones del ensayo de ELISA 12 para confirmar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Tabla N° 07. Absorbancia relativa de diluciones seriadas de la muestra positiva Rap42 frente a diluciones seriadas del antígeno M2N.

Absorbancia relativa Rap42: Rap42 (+)/(AbS/M/NoAg)					
M2N (µg/mL)	1:100	1:200	1:400	1:800	AbS/NoM/Ag
50	1.499	1.813	2.015	2.636	0.258
25	1.638	1.758	2.005	2.518	0.289
12.5	1.585	1.731	1.941	2.472	0.273
8	1.548	1.603	1.890	2.333	0.165
4	1.415	1.399	1.575	1.894	0.131
2	1.424	1.360	1.436	1.623	0.268
AbS/M/NoAg	1.097	1.017	0.819	0.568	
	0.111				
AbS/NoM/NoAg	0.103				
	0.099				
Promedio	0.104				

Ag y M2N: antígeno. AbS/M/NoAg: Anticuerpo secundario/ muestra/ sin antígeno. AbS/NoM/Ag: Anticuerpo secundario/ sin muestra/ con antígeno.

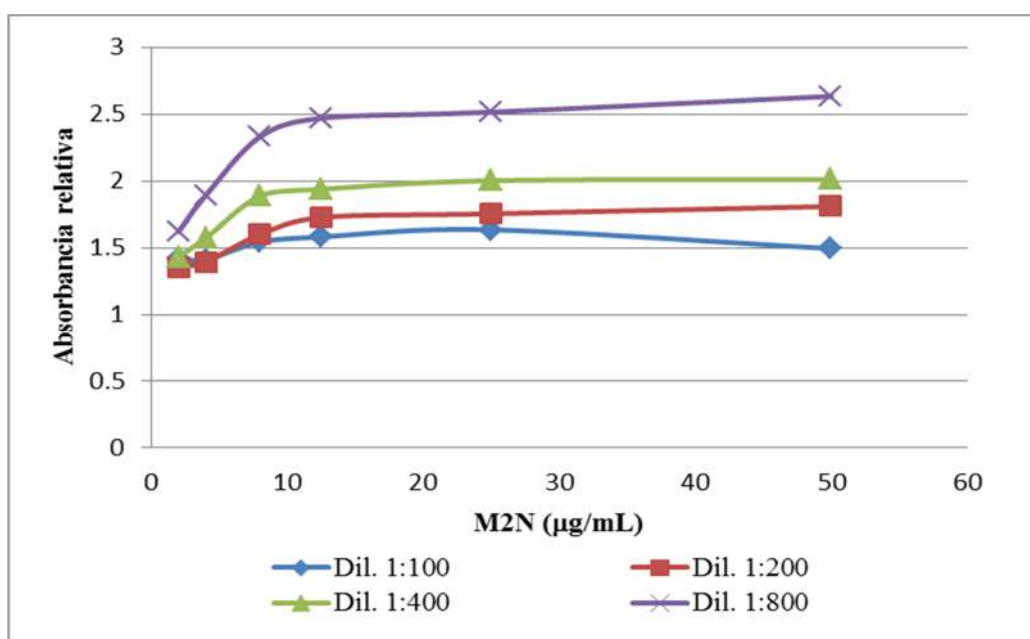


Figura N° 09. Absorbancia relativa de diluciones seriadas de la muestra positiva Rap42 frente a diluciones seriadas del antígeno M2N.

Tabla N° 08. Absorbancia relativa de diluciones seriadas de la muestra negativa CN/LC-01 frente a diluciones seriadas del antígeno M2N.

Absorbancia relativa CN/LC-01: CN/LC-01(-)/(AbS/M/NoAg)					
M2N (µg/mL)	1:100	1:200	1:400	1:800	AbS/NoM/Ag
50	1.042	1.002	1.023	1.420	0.123
25	1.006	0.974	1.010	1.313	0.116
12.5	1.208	1.025	1.163	1.608	0.109
8	0.851	0.847	0.984	1.253	0.128
4	0.955	0.812	0.974	1.172	0.107
2	1.063	0.968	0.924	1.109	0.054
AbS/M/NoAg	1.200	0.918	0.609	0.367	
	0.063				
AbS/NoM/NoAg	0.065				
	0.061				
Promedio	0.063				

Ag y M2N: antígeno. **AbS/M/NoAg**: Anticuerpo secundario/ muestra/ Sin antígeno. **AbS/NoM/Ag**: Anticuerpo secundario/ sin muestra/ con antígeno.

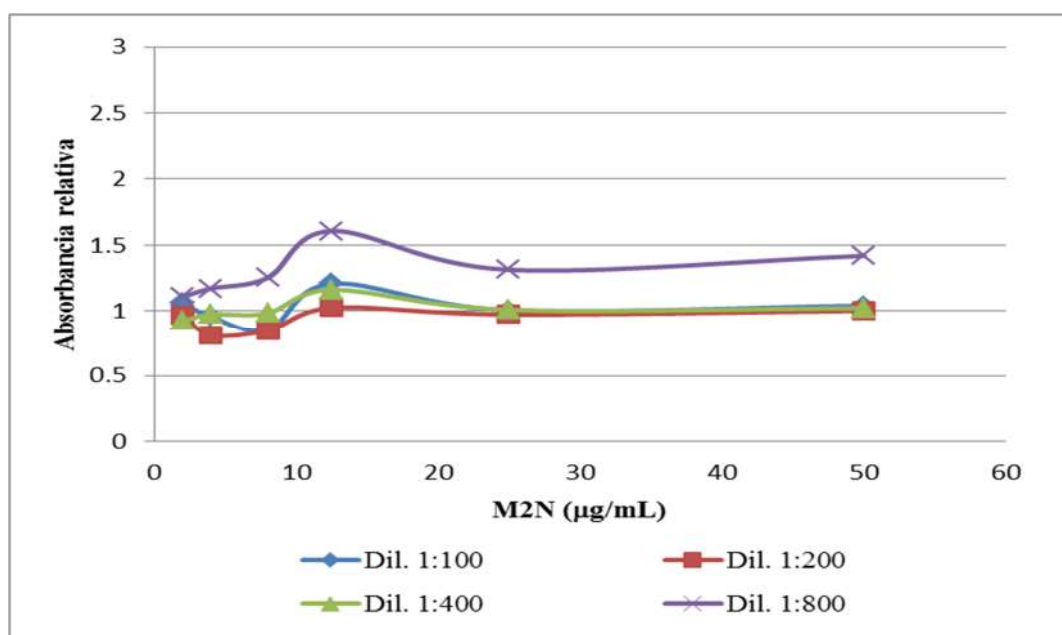


Figura N° 10. Absorbancia relativa de diluciones seriadas de la muestra negativa CN/LC-01 frente a diluciones seriadas del antígeno M2N.

Los ensayos de ELISA 15, 16, 17 (Tabla N° 06) evidenciaron que los niveles de AR entre una muestra positiva (Rap42) comparado con una muestra negativa (CN/LC-01) se diferencian exitosamente empleando tanto la proteína M2N (50 µg/mL) como el ASTL (50 µg/mL y 10.0 µg/mL). Por otra parte, las mejores AR se observaron desde la dilución 1:200 hasta 1:800. Los resultados obtenidos se detallan en las Tablas N° 09, 10 y Figura N° 11.

Las ensayos de ELISA 16, 17 (Tabla N° 06) fueron repeticiones del ensayo de ELISA 15 para corroborar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Tabla N° 09: Diluciones seriadas de las muestras positiva (Rap042) y negativa (CN/LC-01) frente a dos tipos de antígeno M2N; ASTL.

Antígeno	Antígeno (µg/mL)	Rap042			CN/LC-01		
		1:200	1:400	1:800	1:200	1:400	1:800
M2N- 50	50	3.109	4.091	3.942	1.737	1.657	2.184
ASTL - 50	50	3.093	4.718	4.214	1.055	0.830	0.949
ASTL - 10	10	2.406	4.145	3.793	1.012	0.813	0.885
	AbS/M/NoAg	0.559	0.373	0.397	0.487	0.359	0.234
M2N- 50		0.355			0.075		
ASTL - 50	AbS/NoM/Ag	0.085		AbS/NoM/NoAg	0.071		
ASTL - 10		0.097			0.068		
Promedio		0.081		Promedio	0.071		

Ag: M2N y ASTL. **ASTL:** Antígeno soluble total de promastigote de *Leishmania* sp. **AbS/M/NoAg:** Anticuerpo secundario/ muestra/ Sin antígeno. **AbS/NoM/Ag:** Anticuerpo secundario/ sin muestra/ con antígeno.

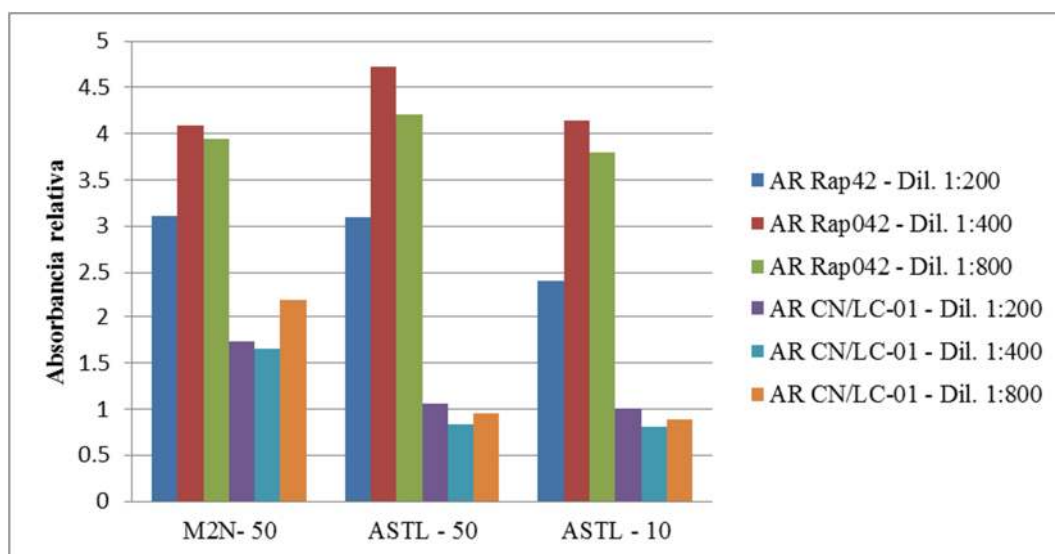


Figura N° 11: Diluciones seriadas de las muestras positiva (Rap42) y negativa (CN/LC-01) frente a dos tipos de antígeno M2N y ASTL.

M2N - 50: Proteína Multi_2 en concentración 50 µg/mL. **ASTL - 50:** ASTL en concentración 50 µg/mL. **ASTL - 10:** en concentración 10 µg/mL.

Tabla N° 10: Ratio de unión entre las absorbancias de muestra positiva (Rap42) y negativa (CN/LC-01) frente a dos tipos de antígeno M2N y ASTL.

Antígeno	Antígeno (µg/mL)	Ratio de unión Pos/Neg: Rap42 (+)/CN/LC-01 (-)		
		1:200	1:400	1:800
M2N- 50	50	2.1	2.6	3.1
ASTL - 50	50	3.4	5.9	7.5
ASTL - 10	10	2.7	5.3	7.3
	AbS/M/NoAg	0.6	0.4	0.4
M2N- 50		0.367		0.075
ASTL- 50	AbS/NoM/Ag	0.202	AbS/NoM/NoAg	0.071
ASTL - 10		0.253		0.068
Promedio		0.274	Promedio	0.071

Ag: M2N y ASTL. **ASTL:** Antígeno soluble total de promastigote de *Leishmania* sp. **AbS/M/NoAg:** Anticuerpo secundario/ muestra/ Sin antígeno. **AbS/NoM/Ag:** Anticuerpo secundario/ sin muestra/ con antígeno.

Finalmente, los ensayos de ELISA 19 y 20 (Tabla N° 06) evidenciaron que al disminuir la concentración de antígenos a la mitad (de 50 µg/mL a 25 µg/mL) se obtuvo resultados (AR) similares a los ensayos de ELISA 15, 16, 17 (Tabla N° 06).

Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos en el proceso de optimización, se estimaron las mejores condiciones para el test M2N-ELISA (véase el protocolo optimizado de ELISA N° 03 - Anexo N° 04) que fue empleado en el proceso de validación analítica de dicho test.

3.3. Validación analítica del test M2N-ELISA.

Las absorbancias relativas obtenidas del análisis de 36 muestras de plasma “positivo” y 47 muestras de suero “negativo” empleando como antígenos a la proteína M2N y al ASTL (ambos a una concentración de 25 µg/mL) se presentan en las Figuras N° 12 y 13.

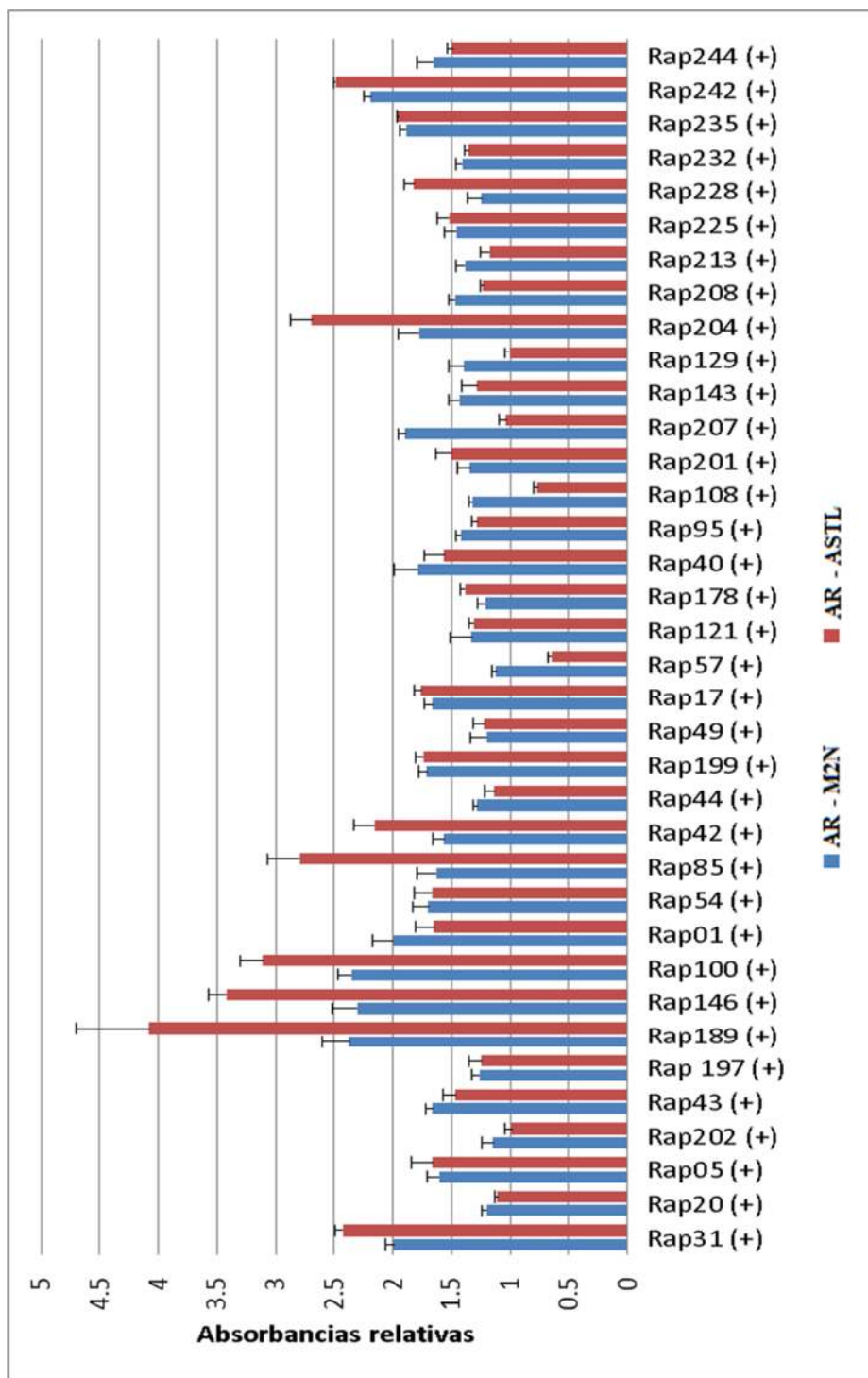


Figura N° 12. Absorbancia relativa de las muestras “positivas” analizadas empleando los test M2N-ELISA y ASTL-ELISA.

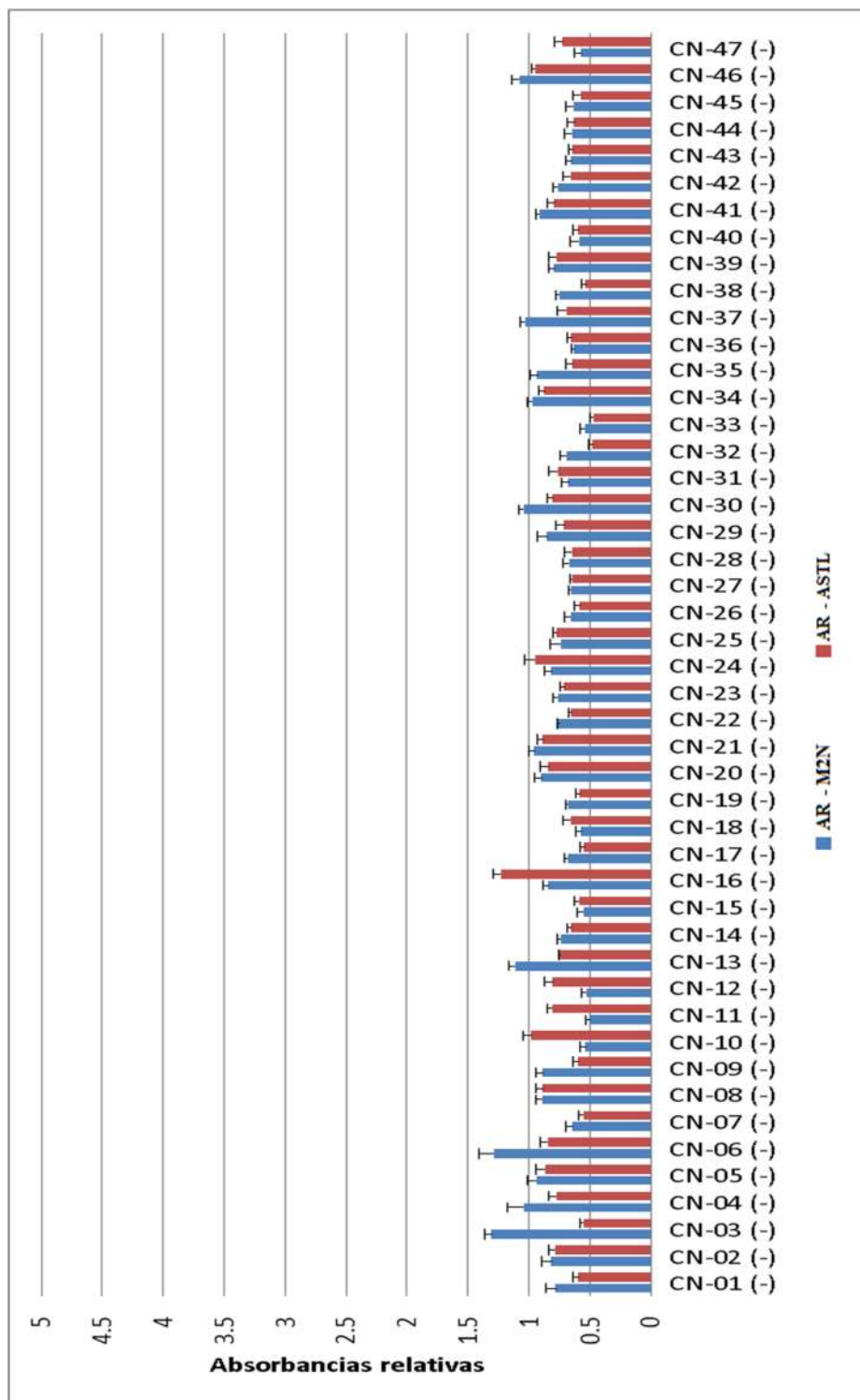


Figura N° 13. Absorbancia relativa de las muestras “negativas” analizadas empleando los test M2N-ELISA y ASTL-ELISA.

3.3.1. Umbral positivo/negativo y Sensibilidad/Especificidad diagnóstica primarias.

La estimación del umbral positivo/negativo (cut-off) se realizó tomando en cuenta lo descrito en el apartado 2.2.5.4.1, obteniéndose un cut-off de 1.177 para el test M2N–ELISA y un cut-off de 1.017 para el test ASTL–ELISA.

Con el umbral positivo/negativo asignado se procedió a estimar la sensibilidad y especificidad diagnóstica primarias. La identificación de las muestras como positivas, o negativas, según el cut-off calculado para cada test de ELISA se señala en las Tablas N° 11, 12 y Figuras N° 14, 15.

Tabla N° 11. Muestras identificadas como positivas y distinguidas como negativas empleando el test M2N–ELISA.

		Pacientes con LC	Controles sanos	Total
M2N–ELISA	Positivo	34	2	36
	Negativo	2	45	47
	Total	36	47	83

Tabla N° 12. Muestras identificadas como positivas y distinguidas como negativas empleando el test ASTL–ELISA.

		Pacientes con LC	Controles sanos	Total
ASTL–ELISA	Positivo	32	1	33
	Negativo	4	46	50
	Total	36	47	83

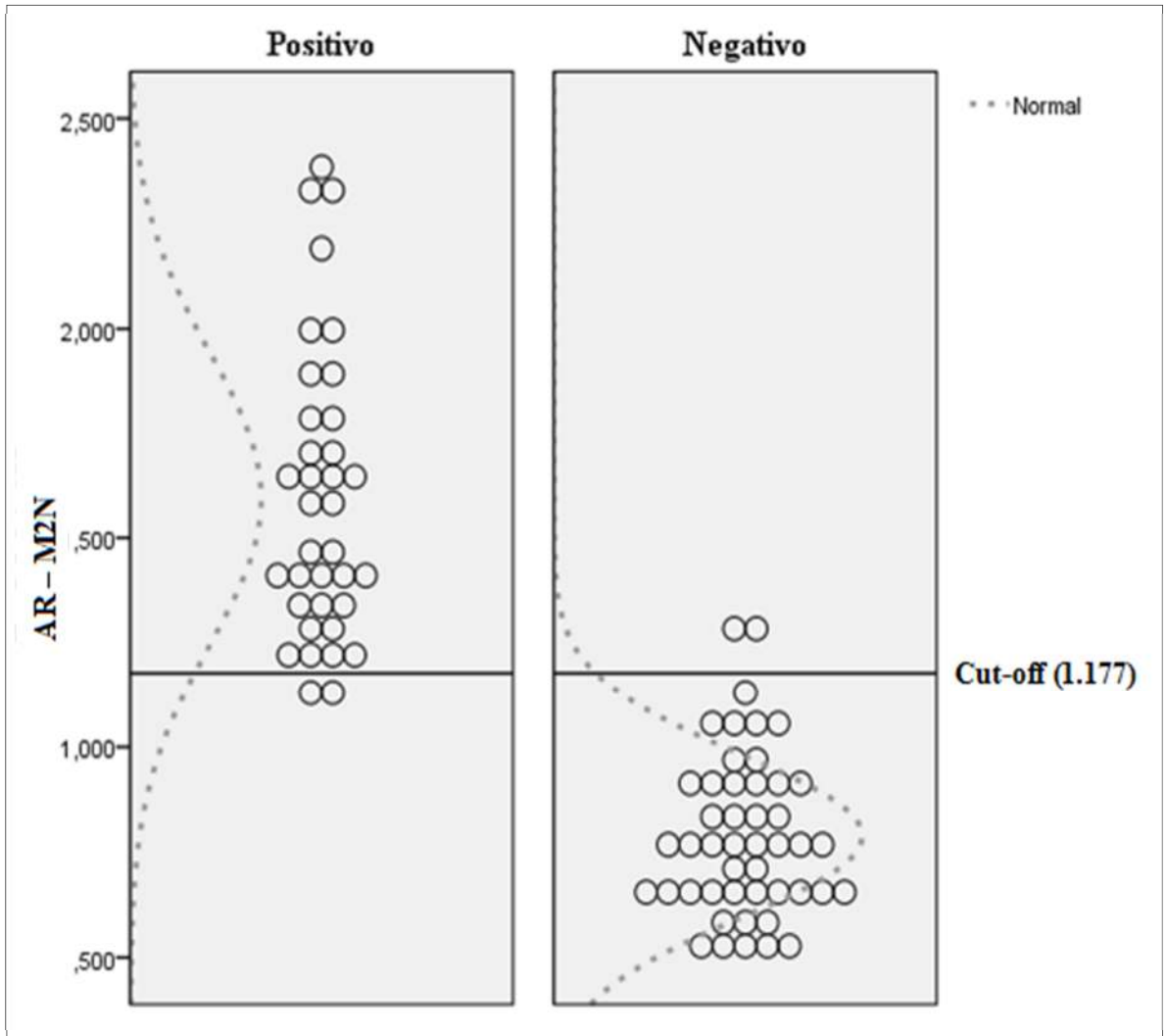


Figura N° 14. Dispersión de las absorbancias relativas de las muestras identificadas como positivas y distinguidas como negativas empleando el test M2N-ELISA.

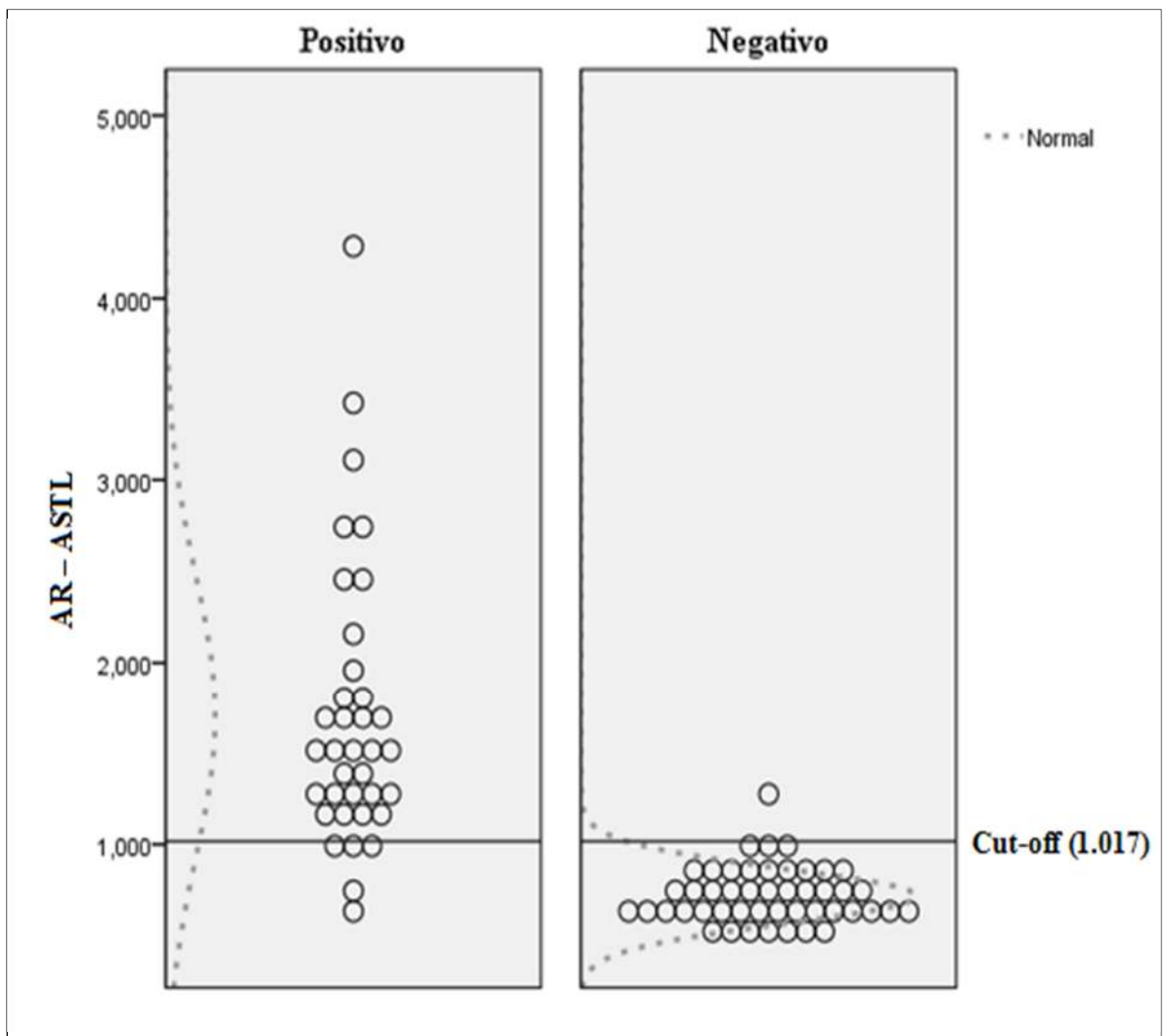


Figura N° 15. Dispersión de las absorbancias relativas de muestras identificadas como positivas y distinguidas como negativas empleando el test ASTL-ELISA.

La sensibilidad y especificidad diagnóstica primarias estimadas para los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA se muestran en la Tabla N° 13.

Tabla N° 13. Sensibilidad y Especificidad diagnóstica primarias de los test de ELISA.

PER	d(%)	1-d(%)	α	M2N–ELISA Media (IC 95%)	ASTL–ELISA Media (IC 95%)
Sensibilidad	7.1%	92.9%	0.05	94.44% (90.73-100)	88.89% (91.10-100)
Especificidad	8.5%	91.5%	0.05	95.74% (85.22 – 99.46)	97.87% (93.23 – 100)

Las AR obtenidas se distribuyeron de manera normal ($p\text{-value} > 0.05$ / Kolmogorov-Smirnov). Los estimadores muestrales (sensibilidad esperada del 95% y especificidad esperada del 90%) se encuentran dentro de los intervalos de confianza hallados para el test M2N–ELISA, por lo tanto, las hipótesis pueden ser consideradas como "verificadas" con una precisión bilateral del 8.5%.

PER: Proporciones estadísticas de rendimiento. **d(%):** Precisión estadística permitida. **1-d (%):** Potencia estadística permitida. **α :** Nivel de significancia bilateral. **IC 95%:** Intervalo de confianza del 95%.

3.3.2. Especificidad analítica.

Se evaluó la especificidad analítica para la enfermedad de Chagas - EsAChagas (reactividad cruzada - RxChagas) que presentan los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA frente a 10 muestras de suero provenientes de pacientes con diagnóstico confirmado para la enfermedad de Chagas (*apartado 2.2.5.4.2*).

Las absorbancias relativas obtenidas del análisis de estos sueros se presentan en las Figuras N° 16, 17. Se observa el incremento de las

absorbancias relativas, desde la dilución 1:800, hasta superar el umbral positivo/negativo (de 1.177) del test M2N–ELISA. Esto se debe más que todo al incremento en la dilución del suero empleado, con lo cual se reduce aún más la cantidad de anticuerpo que pueda unirse a la proteína M2N (producto de la reactividad cruzada) provocando un incremento en la relación entre la absorbancia producto de la unión de un anticuerpo a la proteína M2N y la absorbancia producto de la unión inespecífica del anticuerpo a las proteínas de bloqueo (control AbS/M/NoAg). Por otra parte, todas las absorbancias relativas en el test ASTL–ELISA superan el umbral positivo/negativo (de 1.017) en todas las diluciones ensayadas.

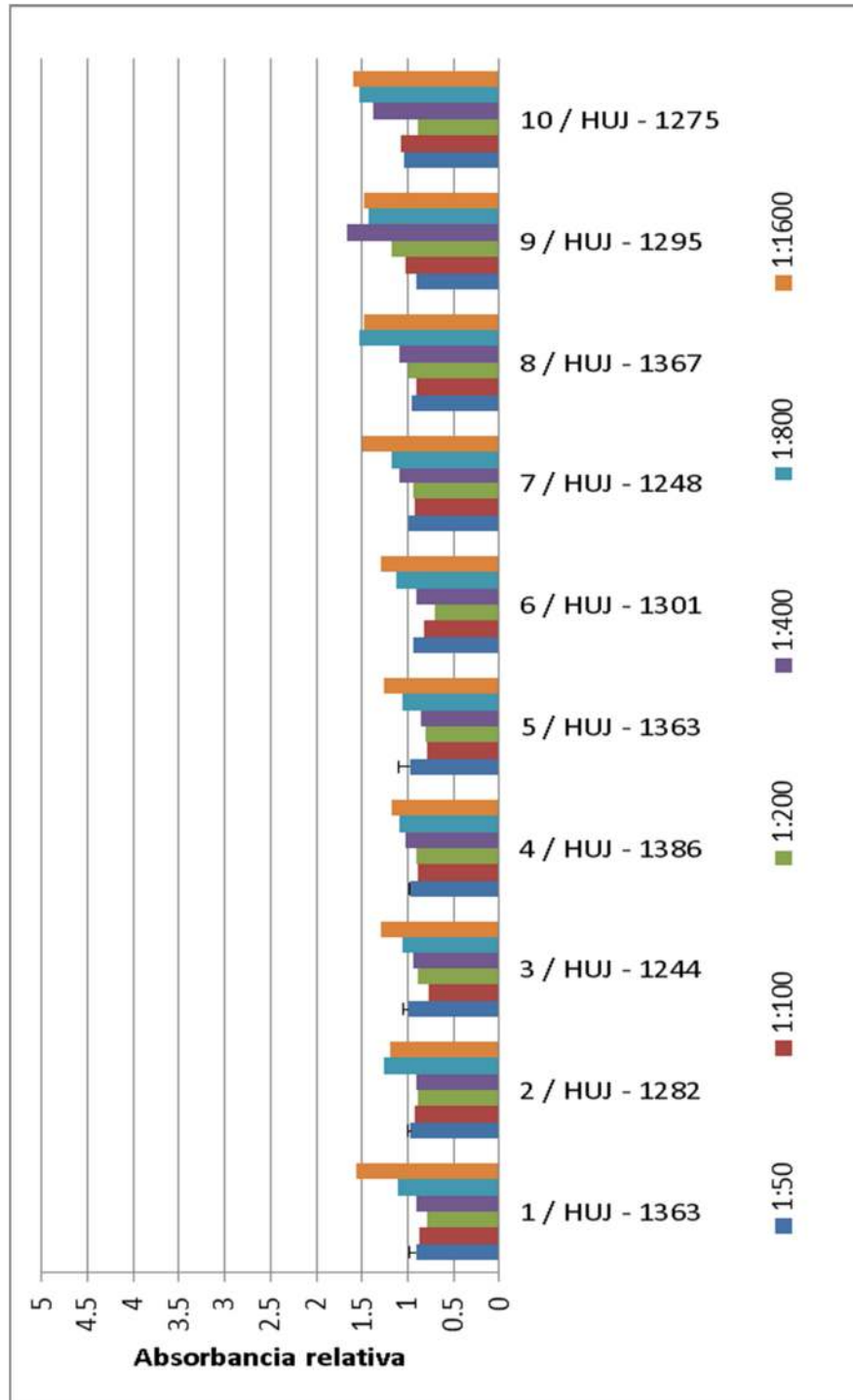


Figura N° 16. Absorbancia relativa de los sueros de pacientes chagásicos analizados empleando el test M2N-ELISA.

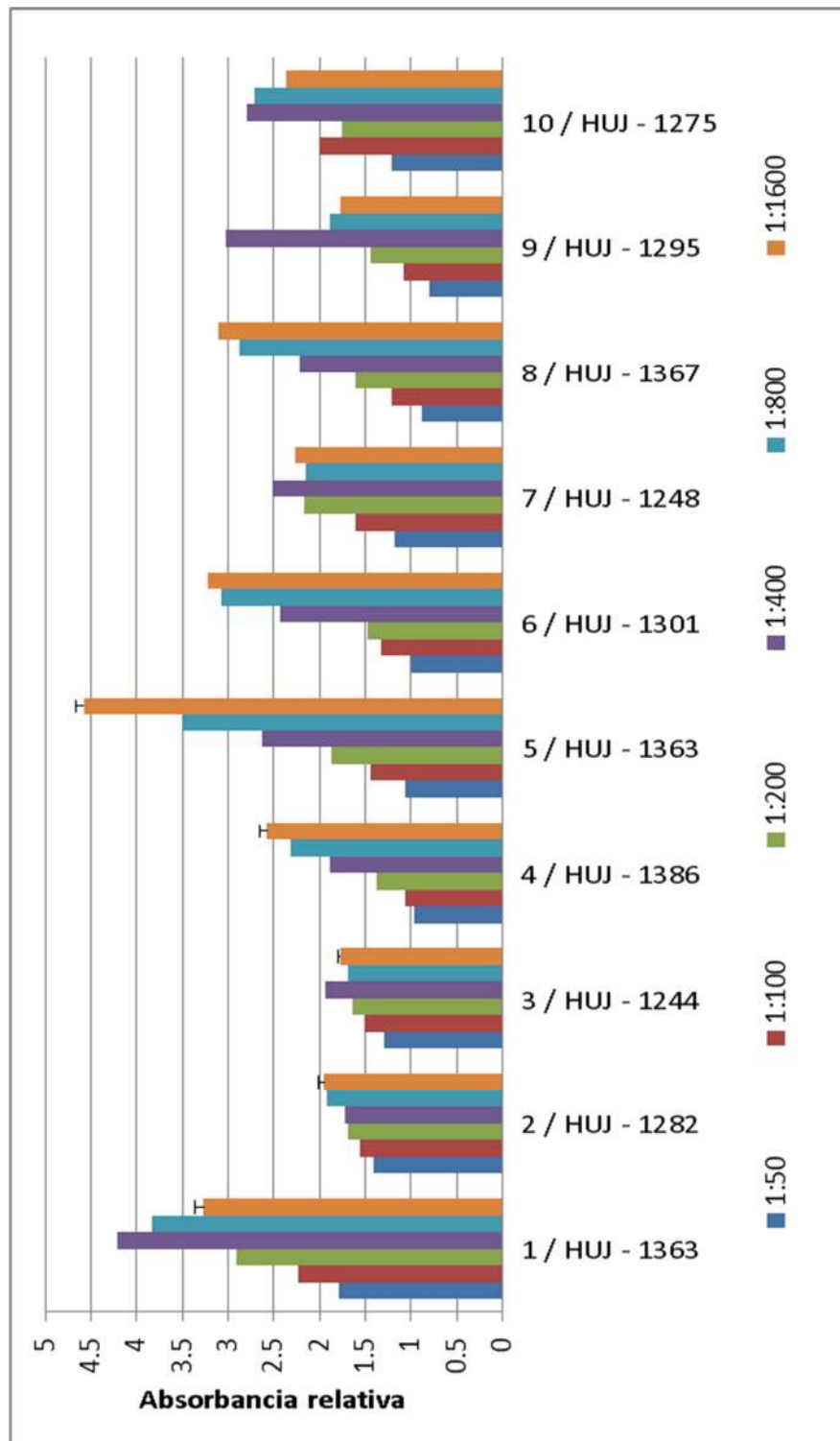


Figura N° 17. Absorbancia relativa de los sueros de pacientes chagásicos analizados empleando el test ASTL-ELISA.

La Figura N° 18 recoge las absorbancias relativas de los sueros de pacientes chagásicos analizados con los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA en una dilución 1:200 (dilución óptima según el protocolo de ELISA N° 03 - Anexo 04). Se puede observar que todos los sueros de pacientes chagásicos analizados reaccionaron como “negativos” con el test M2N–ELISA mientras que con el test ASTL–ELISA reaccionaron como “falsos positivos”.

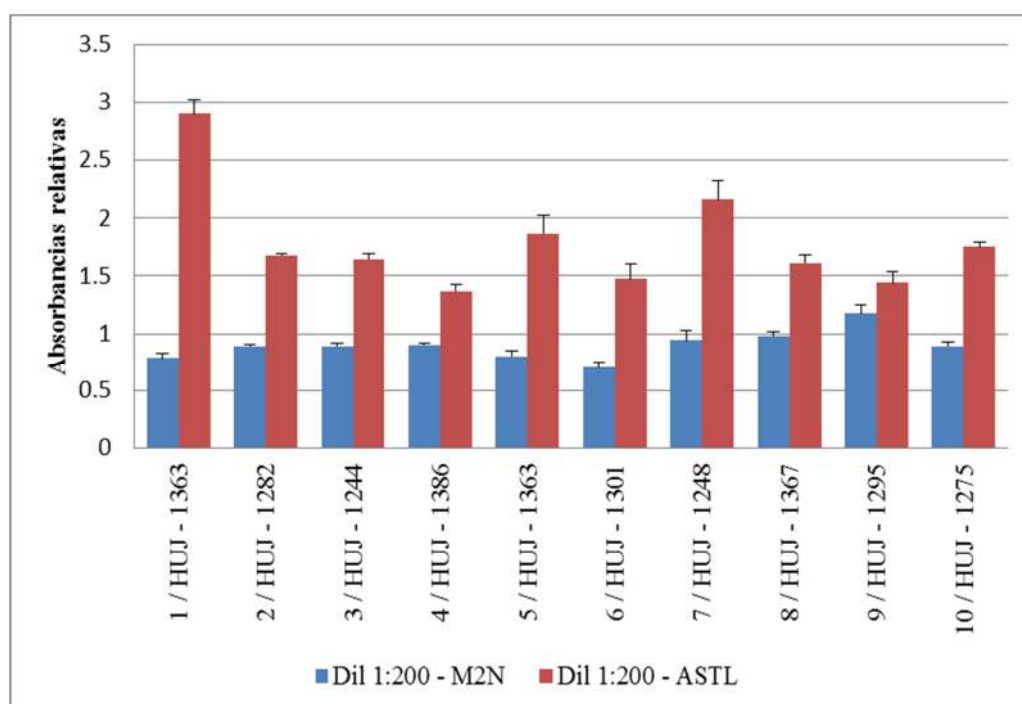


Figura N° 18. Absorbancia relativa de los sueros de pacientes chagásicos analizados empleando los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA.

La estimación de la especificidad analítica y reactividad cruzada de los test de ELISA para la enfermedad de Chagas se muestra en la Tabla N° 14.

Tabla N° 14. Especificidad analítica y reactividad cruzada de los test de ELISA.

PER	d(%)	1-d(%)	α	M2N-ELISA Media (IC 95%)	ASTL-ELISA Media (IC 95%)
Especificidad analítica ECh	18.5%	81.5%	0.05	100% (89.94 –100)	0% (0 - 19.54)
Reactividad cruzada ECh	18.5%	81.5%	0.05	0% (0 - 19.54)	100% (89.94 –100)

Las AR obtenidas se distribuyeron de manera normal ($p\text{-value} > 0.05$ / Kolmogorov-Smirnov). Los estimadores muestrales (EsAChagas del 90% y RxChagas del 10%) se encuentran dentro de los intervalos de confianza hallados para el test M2N-ELISA, por lo tanto, las hipótesis pueden ser consideradas como "verificadas" con una precisión bilateral del 18.5%. **PER:** Proporciones estadísticas de rendimiento. **d(%):** Precisión estadística permitida. **1-d (%):** Potencia estadística permitida. **α :** Nivel de significancia bilateral. **IC 95%:** Intervalo de confianza del 95%.

Adicionalmente, los resultados obtenidos del análisis de las 36 muestras de plasma “positivas” mediante la técnica TESA-Blot para el descarte de anticuerpos IgG anti-*T.cruzi* (*apartado 2.2.5.4.2*) evidenciaron que 31 de las 36 muestras analizadas dieron como resultado **negativo** para la enfermedad de Chagas (ausencia de las bandas TESA y SAPA) (64, 65). Por otra parte, la presencia de la banda TESA (150 – 160 kDa), aunque de manera tenue, indicó positividad para la fase aguda de la enfermedad de Chagas para las muestras Rap 005; Rap 043, Rap121 (Figura N° 19, carriles M2, M8, M17), Rap204, Rap235.

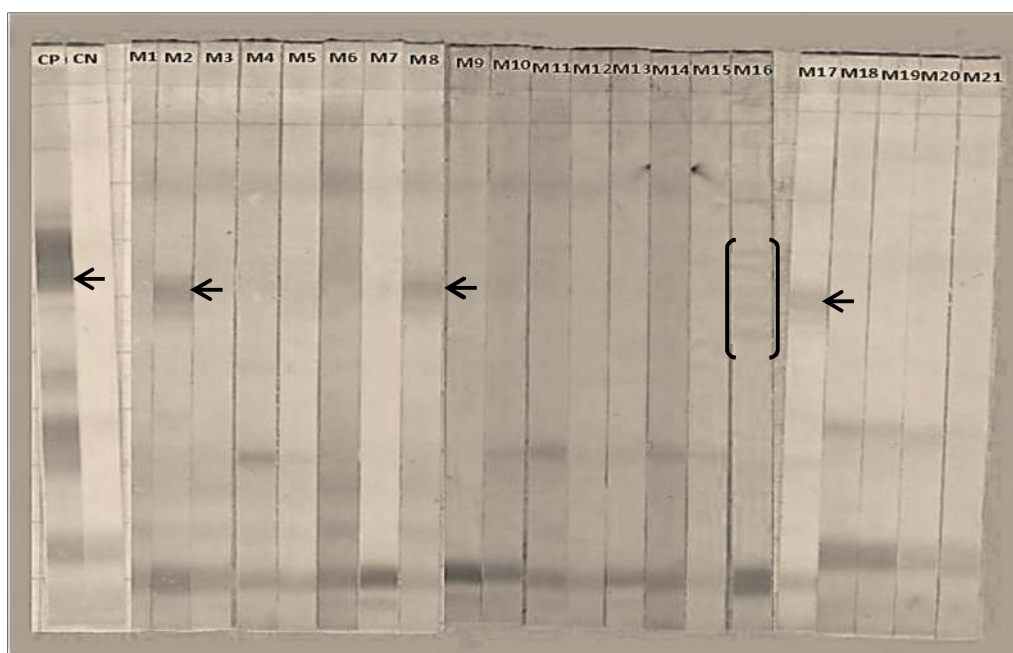


Figura N° 19. Resultados del descarte de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* mediante la técnica TESA-Blot

←: Banda TESA. []: Bandas SAPA. CP: Control positivo. CN: Control negativo. M1: Rap001. M2: Rap005. M3: Rap020. M4: Rap027. M5: Rap031. M6: Rap040. M7: Rap042. M8: Rap043. M9: Rap044. M10: Rap049. M11: Rap054. M12: Rap057. M13: Rap085. M14: Rap095. M15: Rap100. M16: Rap108. M17: Rap121. M18: Rap146. M19: Rap178. M20: Rap189. M21: Rap197.

Además, en el strip de la muestra Rap 108 (Figura N° 19, carril M16) se observa un resultado particular, evidenciado por la presencia de 5 de las 6 bandas propias del patrón SAPA sin la presencia de la banda “TESA-broad”.

3.3.3. Capacidad predictiva diagnóstica del test de ELISA basado en la proteína M2N.

Los resultados de la evaluación de la capacidad predictiva diagnóstica de los test M2N–ELISA y ASTL–ELISA, empleando un modelo de regresión logística binaria simple (63), se muestran en la Tabla N° 15.

Se puede observar que los parámetros β_0 (*cons*), β_1 (*ppm2n*; *ppts1a*); estimados mediante máxima verosimilitud, son significativos (p-values menores que 0.05) para los modelos predictivos de ambos test de ELISA. Dicho resultado muestra que la función predictiva (test diagnóstico de ELISA) es significativa, en términos de PP, para predecir el estatus de infección (presencia o ausencia de anticuerpos enfocados en *L. braziliensis*) de los pacientes con LCA. Además, los pseudo-coeficientes de correlación lineal son altos ($R^2 = 0.8370$ para M2N–ELISA y $R^2 = 0.7178$ para ASTL–ELISA) mostrando un elevado grado de correlación entre los resultados de la predicción diagnóstica obtenidas con los test de ELISA y las categorías “positivo / negativo” de las 83 muestras analizadas.

Tabla N° 15. Capacidad predictiva diagnóstica de los test de ELISA basados en M2N y ASTL.

Estadísticos	M2N–ELISA	ATSL–ELISA	M2N/ASTL–ELISA
$[f_{elisa}(pp) = b_0 + b_1(pp) + \epsilon]$ ^a	$b_{0(cons)} (\alpha = 0.002)$ $b_{1(ppm2n)} (\alpha = 0.003)$	$b_{0(cons)} (\alpha = 0.0)$ $b_{1(ppastl)} (\alpha = 0.0)$	$b_{0(cons)} (\alpha = 0.018)$ $b_{1(ppm2n)} (\alpha = 0.028)$ $b_{2(ppastl)} (\alpha = 0.066)$
Pseudo R2 ^b	0.84	0.72	0.90
ppCut-off ^c	50%	50%	50%
Sensibilidad ^c	97.22%	88.89%	94.44%
Especificidad ^c	95.74%	95.74%	95.74%
Máximo IY ^d	0.9297	0.9019	0.9296
ppCut-off ^d	55.39%	37.61%	46.60%
Sensibilidad ^e	97.22%	94.44%	97.22%
Especificidad ^e	95.74%	95.74%	95.74%
Hosmer/Lemeshow ^f	$\alpha = 0.843$	$\alpha = 0.796$	$\alpha = 1.000$
AUC-ROC ^g	0.9917	0.9734	0.9970

Se muestra la capacidad predictiva diagnóstica de los test M2N–ELISA; ASTL–ELISA y un modelo combinado de los 2 test (M2N/ASTL–ELISA).

a: Significancia (p-value) de los parámetros b_0 , b_1 de la función predictora diagnóstica $[f_{elisa}(pp)]$ para cada test de ELISA. **b:** Nivel de correlación de los datos de PP con el modelo predictivo diagnóstico para cada test de ELISA. **c:** Valores de sensibilidad y especificidad estimados tomando en cuenta el PP cut-off de 50%. **d:** PP cut-off seleccionado según el máximo nivel de IY alcanzado para cada test de ELISA. **e:** Valores de sensibilidad y especificidad estimados tomando en cuenta el PP cut-off mostrado en la fila superior. **f:** Capacidad de predicción diagnóstica de cada test de ELISA según el nivel de significancia de la prueba de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow. **g:** El área bajo la curva ROC muestra la probabilidad de detección de anticuerpos enfocados en *L. braziliensis* en muestras de suero/plasma para cada test de ELISA.

Tomando en cuenta que el paquete estadístico (de manera pre-establecida) ha seleccionado un ppCut-off del 50%, los modelos predictivos muestran potenciales valores óptimos para la sensibilidad diagnóstica primaria de 97.22% para M2N-ELISA y de 88.89% para ASTL-ELISA, y una especificidad diagnóstica primaria del 95.74% para ambos test (Tabla N° 17). Sin embargo, empleando el **Índice de Youden (IY)** fue posible hallar valores más destacados para la sensibilidad y especificidad diagnóstica primarias. La Tabla N° 15 muestra los valores más altos del IY para cada test de ELISA, con el cual se pudo seleccionar el ppCut-off adecuado para estimar las sensibilidades y especificidades más destacadas para los test M2N- y ASTL-ELISA. Con un ppCut-off de 55.39%, el test M2N-ELISA logró alcanzar una sensibilidad del 97.22%. Por otra parte, con un ppCut-off de 37.71%, el test ASTL-ELISA logró alcanzar una sensibilidad del 94.44%. En cambio, la especificidad alcanzó un valor de 95.74% para ambos test de ELISA.

La capacidad predictiva diagnóstica fue ensayada mediante la prueba de bondad de ajuste de “Hosmer - Lemeshow” (Tabla N° 15). Se evidencia que ambos test de ELISA tienen una buena capacidad de predicción de la presencia de anticuerpos enfocados en *L. braziliensis* (los niveles de significancia son bastante altos), aunque el test M2N-ELISA posee un mayor nivel de significancia (p-value = 0.843) frente al test ASTL-ELISA (p-value = 0.796). Por lo tanto, se puede asumir que el test ASTL-ELISA tiene un valor predictivo positivo débil reflejado en la menor *sensibilidad* alcanzada (88.89% con AR y de 94.44% con PP ajustado con el IY) frente

a la sensibilidad alcanzada por el test M2N-ELISA (94.44% con AR y 97.22% con PP ajustado con el IY). Las diferencias en las capacidades diagnósticas de los test M2N-ELISA y ASTL-ELISA también se ven reflejadas por las áreas bajo la curva ROC de cada test de ELISA. La Tabla N° 15 y la Figura N° 20 muestran que el test M2N-ELISA puede explicar el 99.17% de las muestras analizadas, mientras que el test ASTL-ELISA puede explicar el 97.34% de las muestras analizadas.

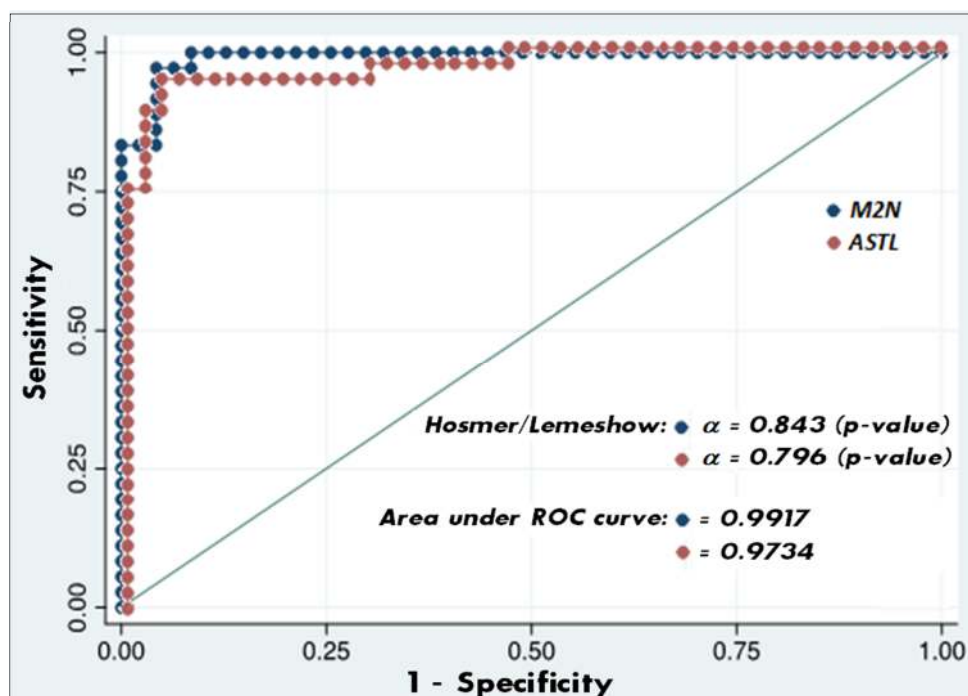


Figura N° 20. Curvas ROC de los test M2N-ELISA y ASTL-ELISA.

La Tabla N° 17 también muestra la evaluación de un modelo predictivo diagnóstico combinando los dos test M2N-ELISA y ASTL-ELISA con la intención de observar si el uso simultáneo del test serológico convencional (ASTL-ELISA) con el test serológico basado en el antígeno multiepitópico recombinante (M2N-ELISA) puede mejorar las

proporciones estadísticas de rendimiento y sus valores predictivos. Se observa que los parámetros β_0 (*cons*), β_1 (*ppm2n*) son significativos (p-value menores que 0.05 para el modelo predictivo combinado de ambos test de ELISA). Sin embargo, se observa que el parámetro β_2 (*ppts1a*) no es significativo (p-value mayor a 0.05) para el test M2N / ASTL–ELISA. Tales resultados evidencian que los valores de PP del test ASTL–ELISA afectan negativamente a la función predictiva combinada (test diagnóstico M2N / ASTL–ELISA); aunque sigue siendo significativa (si tomamos en cuenta los valores de PP del test M2N–ELISA) para predecir el estatus de infección (presencia de anticuerpos enfocados en *L. braziliensis*) de los pacientes con LC. Además, el pseudo-coeficiente de correlación lineal es más alto ($R^2=0.9036$) que los test de ELISA por separado ($R^2 = 0.8370$ para el test M2N–ELISA y $R^2 = 0.7178$ para el test ASTL–ELISA). Esto muestra un elevado grado de correlación entre los resultados de la predicción diagnóstica obtenidas con los test de ELISA y las categorías “positivo / negativo” de las 83 muestras analizadas.

Por otra parte, la Tabla N° 15 muestra que el modelo predictivo combinado (test M2N/ ASTL–ELISA) alcanza potenciales valores óptimos para la sensibilidad diagnóstica primaria de 94.44%, la cual es menor que el test M2N–ELISA (97.22%) y mayor que el test ATSL–ELISA (88.89%). De otro lado, la especificidad diagnóstica primaria para la técnica combinada es de 95.74%, coincidiendo con los mismos valores alcanzados por los test de ELISA separados y tomando en cuenta un ppCut-off del 50% el cual fue seleccionado por el paquete estadístico

STATA. Aunque, también se muestra que con el valor de IY de 0.9296 se estima un ppCut-off de 46.6% con el cual se logra un balance entre las dos proporciones estadísticas de rendimiento; las cuales se encuentran por encima del 95% (sensibilidad del 97.22% y especificidad del 95.74%).

La prueba de bondad de ajuste de “Hosmer - Lemeshow” para el modelo predictivo combinado (Tabla N° 15) muestra el más alto nivel de significancia (p-value = 1.000). Este resultado indica que el uso combinado de los dos test de ELISA logra una alta capacidad de predicción de la presencia de anticuerpos enfocados en *L. braziliensis*.

Finalmente, en la Tabla N° 15 y la Figura N° 21 se observa que el área bajo la curva ROC del test M2N /ATSL–ELISA puede explicar el 99.70% de los casos; el cual es mayor al de los test por separado (99.17% para M2N–ELISA y 97.34% para ASTL–ELISA).

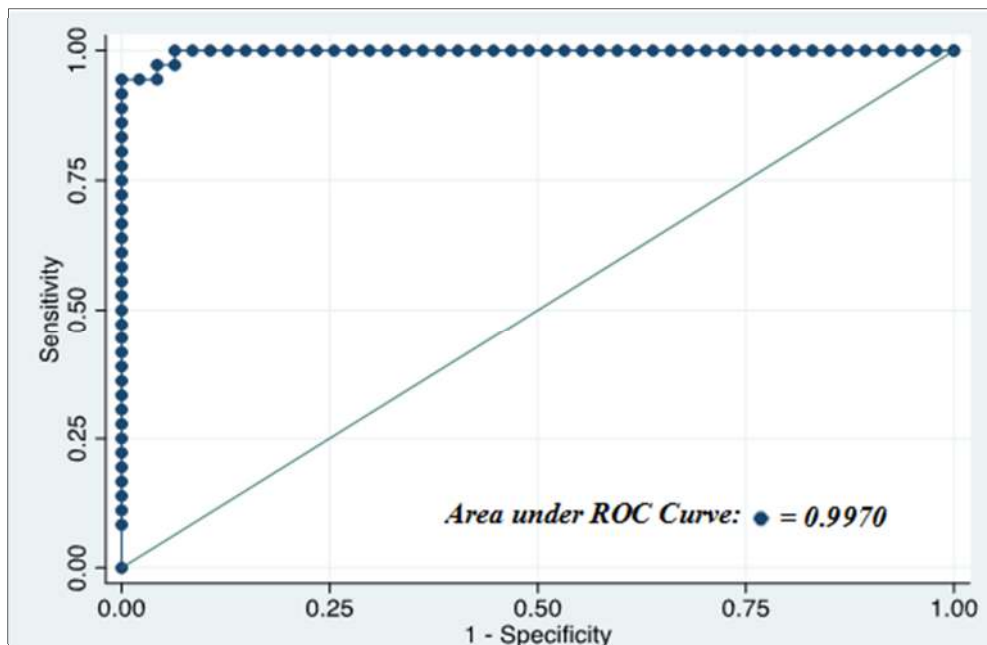
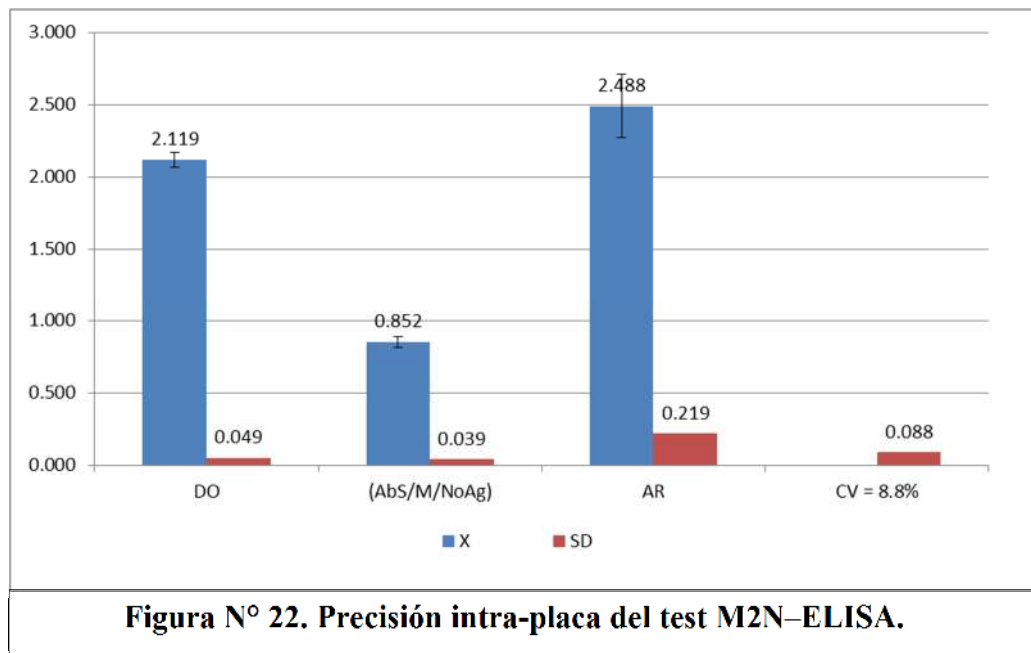


Figura N° 21. Curva ROC del test M2N/ASTL–ELISA.

3.3.4. Precisión analítica.

Se evaluó la precisión analítica que presenta el test M2N–ELISA frente a 17 muestras de plasma de pacientes con diagnóstico confirmado para LCA (positivas).

3.3.4.1. Precisión intra-placa: Los resultados se pueden observar en la Figura N° 22 que muestra el promedio de las absorbancias del “control AbS/M/NoAg”, el promedio de las densidades ópticas [\bar{X} (DO)], el promedio de las absorbancias relativas [\bar{X} (AR)], las desviaciones estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV%). El CV% alcanzado fue de 8.8%.



3.3.4.2. Precisión inter-placas: Los resultados (Figura N° 23) muestran el promedio de las absorbancias del “control AbS/M/NoAg”, el promedio de las densidades ópticas [\bar{X} (DO)], el promedio de las absorbancias relativas [\bar{X} (AR)] y las desviaciones estándar (SD) resultantes del análisis de las muestras positivas. El promedio del CV% de las 17 muestras ensayadas fue de 9.17%.

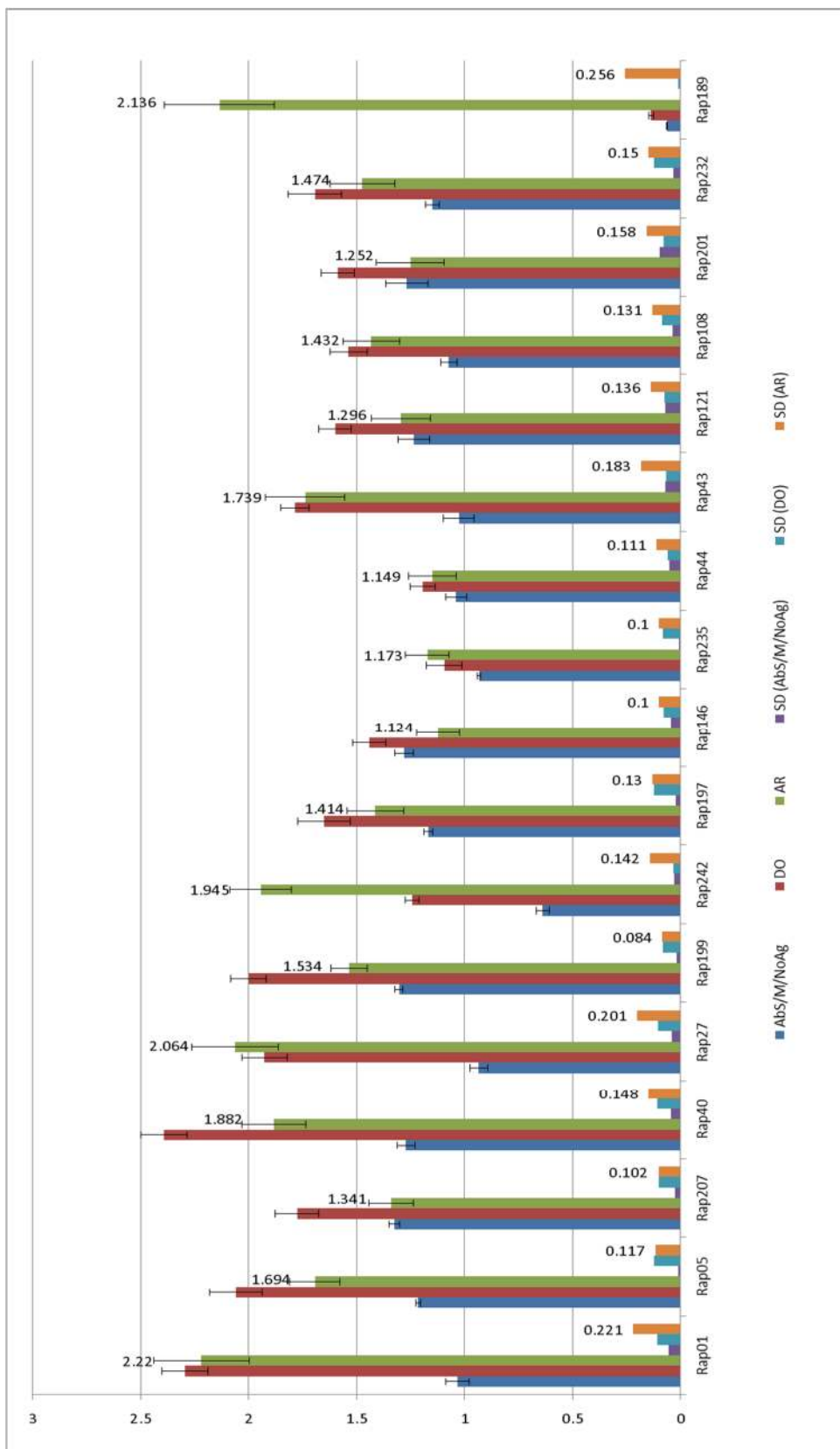


Figura N° 23. Precisión inter-placas del test M2N-ELISA

3.3.4.3. Precisión inter-diario.

La Figura N° 24 muestra los resultados de la precisión inter-diario (análisis de 17 muestras positivas en 3 placas por 3 días). Se aprecia el promedio de las absorbancias del “control AbS/M/NoAg”, el promedio de las densidades ópticas [\bar{X} (DO)], el promedio de las absorbancias relativas [\bar{X} (AR)] y las desviaciones estándar (SD) resultantes del análisis de las muestras positivas. El promedio del CV% de las 17 muestras ensayadas fue de 8.125%.

Las muestras (Rap43 y CN/LC-01) fueron analizadas empleando ambos antígenos M2N y ASTL. En la Figura N° 25 se observa el promedio de las absorbancias relativas (M2N y ASTL), las desviaciones estándar de éstas (SD) y los coeficientes de variación (CV%) calculados para cada caso (considerando muestra y antígeno empleado). Los CV% para el test M2N–ELISA fueron: 7.3% para la muestra Rap043 y 7.7% para la muestra CN/LC-01; y los CV% para el test ASTL–ELISA fueron: 8.5% para la muestra Rap043 y 9.21% para la muestra CN/LC-01.

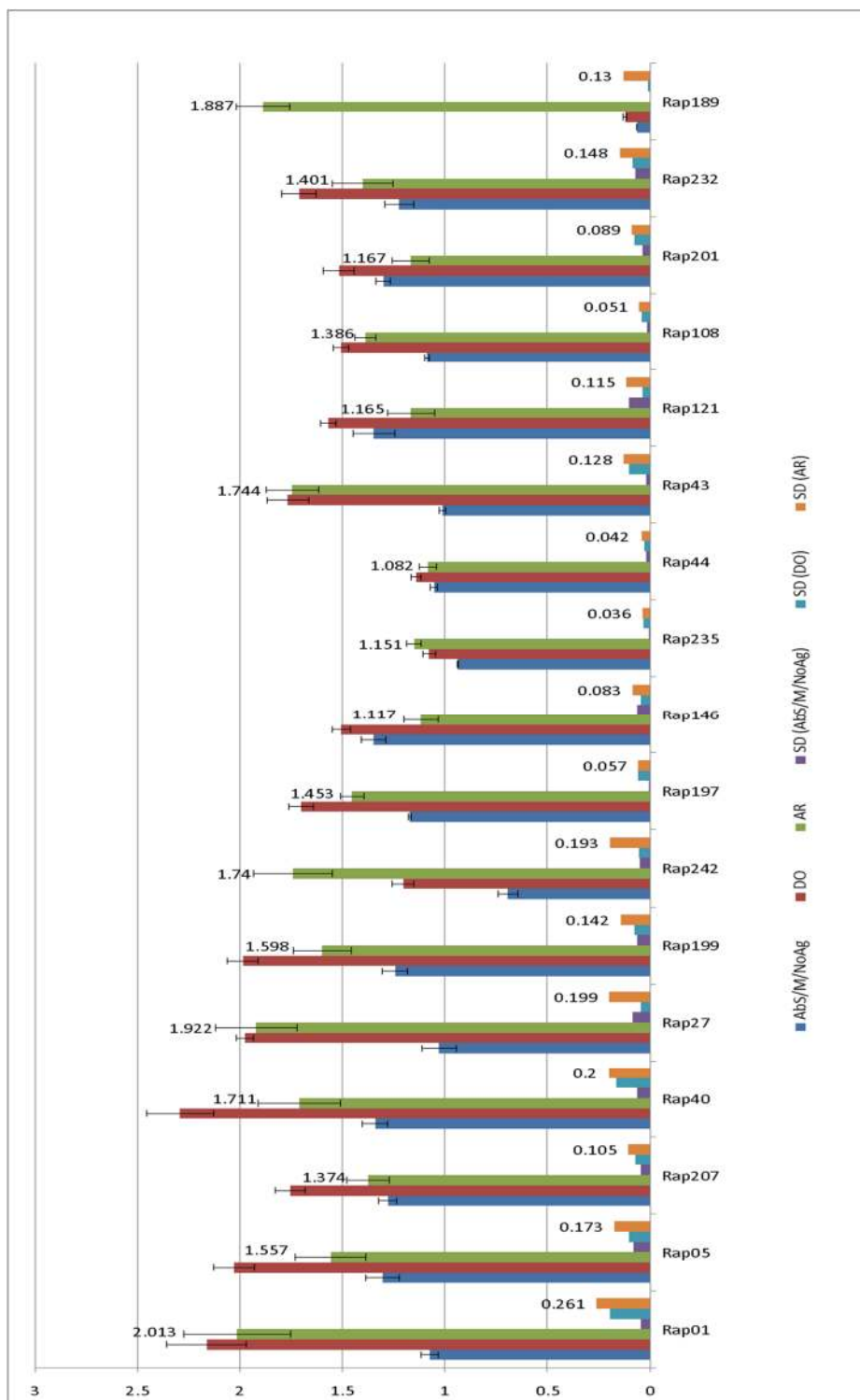


Figura N° 24: Precisión Inter-diario (heterogéneo) del test M2N-ELISA.

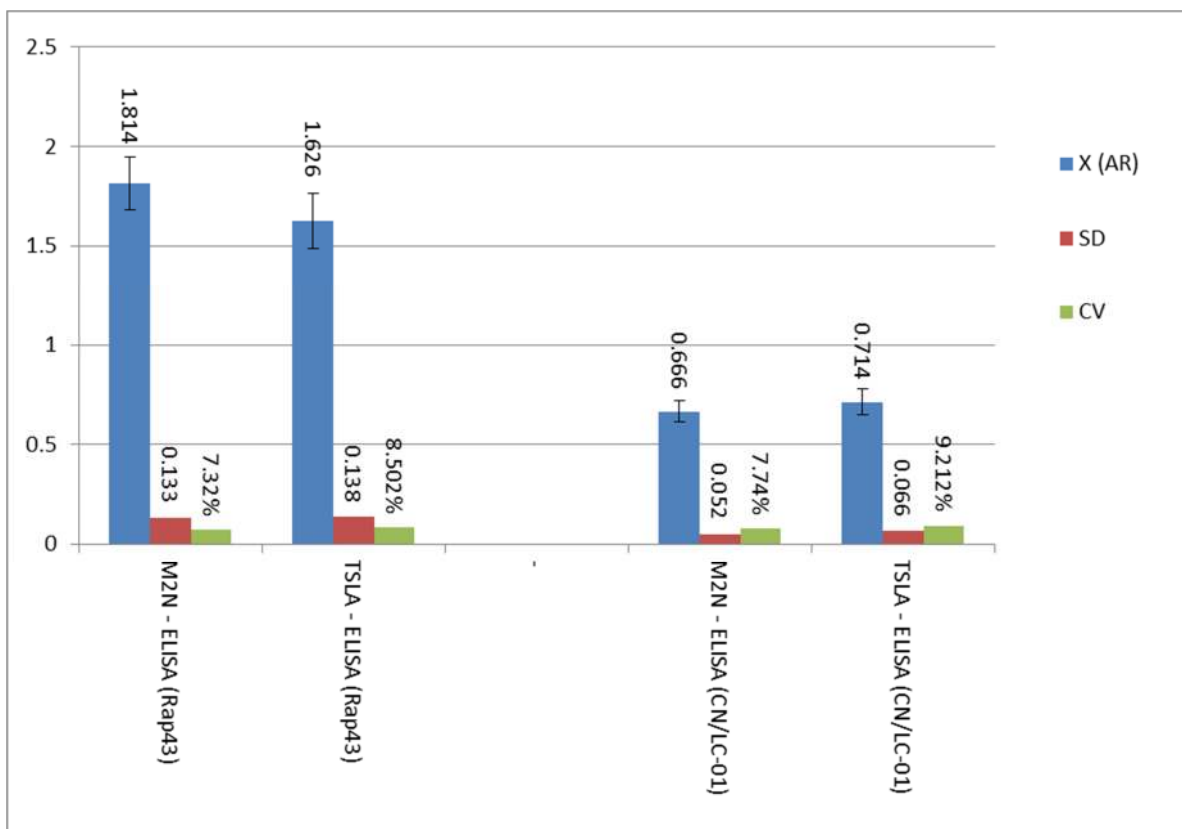


Figura N° 25: Precisión Inter-diario (homogéneo) del test M2N-ELISA.

3.3.4.4. Control del proceso analítico del test M2N-ELISA.

Con los promedios y las desviaciones estándar obtenidos de los ensayos de precisión intra-placa, inter-placa e inter-diario se elaboraron gráficas de Levey-Jennings para evaluar la calidad del proceso analítico en una misma placa, en distintas placas y en distintos días durante los ensayos de precisión mediante la aplicación de las reglas de control de Westgard (*apartado 2.2.6*) sobre la dispersión de los resultados (absorbancias relativas) frente al promedio de éstos.

Se observa en las Figuras N° 30 a la 36 (Anexo N° 05) que los procesos analíticos (ensayos de precisión intraplaca, interplaca e inter-diario)

cumplen con las reglas de control de Westgard (*apartado 2.2.6*). Por lo tanto, se asume como válido el test M2N–ELISA para el análisis repetido de sueros/plasma en una misma placa, en distintas placas en un mismo día y en distintas placas en distintos días con las precisiones estimadas que se resumen en la Tabla N° 16.

Tabla N° 16. Precisión analítica de los test de ELISA.

PER		M2N–ELISA	
Precisión intra-placa		8.8%	
Precisión inter-placa		9.17%	
Precisión inter-diario heterogéneo		8.13%	ASTL–ELISA
Precisión inter-diario homogéneo	muestra positiva	7.32%	8.5%
	muestra negativa	7.74%	9.21%

PER, Proporciones estadísticas de rendimiento.

IV. DISCUSIÓN

En los últimos años, diversas investigaciones evidenciaron que el empleo de proteínas multiepitópicas recombinantes (como antígenos en un formato de ELISA) fue la estrategia más destacada para mejorar el desempeño diagnóstico para diversas enfermedades infecciosas tales como la leishmaniosis visceral en humanos y perros (22), enfermedad de Chagas (29, 69–71), dengue (72-75), toxoplasmosis (76), y hepatitis viral C (77).

Aunque los test de ELISA tradicionales para el diagnóstico de LC (basados en el empleo del antígeno total soluble de *Leishmania* sp - ASTL) presentan una elevada reactividad cruzada con la enfermedad de Chagas (ocasionado principalmente por la complejidad del ASTL) y una sensibilidad muy variable (causada por los bajos títulos de anticuerpo circulante), aún no se han reportado estudios que evalúen el desempeño de un test de ELISA basado en proteínas multiepitópicas recombinantes para el diagnóstico de LC. Motivo por el cual, en el presente estudio se desarrolló y validó analíticamente un test de ELISA indirecto basado en las propiedades mimotópicas de los péptidos conformantes de la proteína multiepitópica recombinante M2N.

Dado que nuestro objetivo fue desarrollar un test para detectar anticuerpos circulantes anti-*Leishmania* (enfocado en *L. braziliensis*), la estrategia de predicción de epítopes (que estuvo a cargo del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular-LID) se basó en la predicción de epítopes lineales para células T presentados en el contexto del complejo MHC clase II, los que presentan alta probabilidad teórica de ser el componente lineal de los epítopes conformacionales para células B (Dr. Mirko Zimic, comunicación personal). Como último paso de la

predicción *in silico*, los epítopes T candidatos pasaron por un filtro de epítopes para células B (Flujograma N° 1, apartado 1.3.5).

En el presente trabajo, el gen sintético diseñado, codificante para la proteína mutiepitópica M2N, fue clonado y expresado en *E. coli* como antígeno recombinante. La evaluación del desempeño diagnóstico de este antígeno para LCA fue realizada en el formato de test de ELISA indirecto y comparada con el desempeño del antígeno tradicional, ASTL. Se estimó que la sensibilidad y especificidad diagnóstica primaria para LCA empleando el test M2N – ELISA fueron del 94.4% y del 95.74% respectivamente. En comparación, la sensibilidad y especificidad diagnóstica primaria estimadas para LCA con el test ASTL–ELISA fueron de 88.89% y 97.87% respectivamente. Además, se estimó que el test M2N–ELISA alcanzó una especificidad analítica del 100% frente a sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas, en comparación con el test ASTL–ELISA que obtuvo un 0% de especificidad analítica frente a la misma enfermedad. Igualmente, se estimó que el test M2N–ELISA puede identificar anticuerpos anti-*Leishmania* (enfocado en *L. braziliensis*) presentes en muestras positivas con una probabilidad del 99.17%. En cambio, el test ASTL–ELISA logra identificar anticuerpos anti-*Leishmania* (enfocado en *L. braziliensis*) presentes en muestras positivas con una probabilidad del 97.32%. Si se emplea un test combinado de ambos antígenos (M2N/ASTL–ELISA) dicha probabilidad se incrementa al 99.70%. Finalmente, se estimó que la precisión del test M2N–ELISA (Intra-placa de 8.8%, Inter-placas de 9.14% e Inter-diario de 9.13%) se ubica dentro del límite aceptado del 10% para los test de ELISA (33).

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos con el test M2N–ELISA (94.4% de sensibilidad y 95.74% de especificidad) son comparables con los valores obtenidos con los test de ELISA basados en las proteínas recombinantes rCatL (96.92% de sensibilidad y 95.71% de especificidad) y rHSP83 (100% de sensibilidad y especificidad) (11, 31) respectivamente (Tabla N° 02, *apartado 1.3.3.1*). Aunque, es necesario resaltar que la cantidad de muestras de suero de pacientes con diagnóstico confirmado para LCA empleadas para evaluar la proteína rHSP83 fue únicamente de 10; una cantidad muy baja con un IC95% bastante amplio que no fue reportado (11).

Por otra parte, se observa que la sensibilidad del test M2N–ELISA [94.4%, IC95% (90.73 – 100)%] evidenció una tendencia a ser más elevada que el test ASTL–ELISA [88,89%, IC95% (85.22 – 99.46) %]. De hecho, las sensibilidades obtenidas por varios test de ELISA basados en ASTL de diversas especies de *Leishmania* sp fueron bastante mixtas, por ejemplo, la sensibilidad del 41% (empleando ASTL de *L. amazonensis*) (14) y la sensibilidad del 67% (empleando ASTL de *L. major*) (38). Aunque cabe recordar que 5 test de ELISA indirecto basados en ASTL obtuvieron valores de sensibilidad por encima del 90% (13–15, 17, 19) (Tabla N° 02, *apartado 1.3.3.1*).

Si bien las sensibilidades y especificidades del test M2N–ELISA (94.4% y 95.74% respectivamente) y del test ASTL–ELISA (88.89% y 97.87% respectivamente) son comparables entre sí; no obstante, las reactividades cruzadas con la enfermedad Chagas (Rx) perfilan una diferencia notable puesto que la Rx del test M2N–ELISA (0%) fue la más baja comparada con la Rx del test ASTL–ELISA (100%). En cambio, la Rx del test M2N–ELISA (0%) es más comparable

con la Rx del 5% obtenido para un test de ELISA basado en el péptido derivado de la proteína CatL para el serodiagnóstico de LV (31) y con la Rx del 0% para el test de ELISA basado en la proteína rHSP83 para el serodiagnóstico de LC (11). Por el contrario, la Rx del test ASTL–ELISA (100%) es más comparable con los valores de Rx de 94.5% y 91.3% obtenidos por dos test de ELISA basados en ASTL de *L.braziliensis* (15) y *L.major* (11) respectivamente. Por lo tanto, tomando en cuenta la Rx estimada para el test M2N–ELISA (0%), se asume que dicho test diagnóstico brinda mayor seguridad, comparado con el test ASTL–ELISA, de obtener verdaderos positivos para LCA sin tener que realizar un descarte previo para la enfermedad de Chagas a las muestras que se deseen analizar.

Adicionalmente, las 36 muestras de plasma de pacientes diagnosticados con LCA (empleados para la validación diagnóstica del test M2N–ELISA) fueron analizadas mediante la técnica TESA-Blot para el descarte de la enfermedad de Chagas. Los resultados mostraron que 5 muestras de plasma fueron positivas al presentar la banda “TESA-broad” entre 130 – 170 kDa, la cual es específica de los anticuerpos anti-*T.cruzi* (ya sea en la fase aguda o crónica de la enfermedad de Chagas). Tomando en cuenta que el IC95% estimado para la RxChagas con el test M2N–ELISA fue [0 - 19.14%], no sorprende que 5 muestras de plasma de 36, en otras palabras 14% de las muestras de LCA analizadas, presentaran reactividad cruzada con la enfermedad de Chagas. Es importante señalar que si bien la prueba TESA-Blot evidenció una elevada especificidad y sensibilidad para la enfermedad de Chagas (64, 65, 78, 79), podemos estar frente a falsos positivos, sobre todo considerando que las muestras analizadas corresponden a pacientes con

diagnóstico confirmado de LCA. En conjunto, los resultados deben analizarse tomando en cuenta dos aspectos: (i) criterios de diagnóstico: para establecer una infección por *T. cruzi*, es necesario que por lo menos dos pruebas serológicas que usen diferentes antígenos del parásito resulten positivas; y (ii) antecedentes epidemiológicos compatibles con infección por *T. cruzi*. Con respecto a este último, en la ciudad de Sicuani en Cusco, donde se enrolaron los pacientes con diagnóstico de LCA aquí estudiados, no se han reportado casos de Chagas (Dra. María Cruz Saldarriaga, Médico Especialista en Enfermedades Infecciosas y Tropicales, Hospital Nacional Adolfo Guevara Velasco – Cusco; comunicación personal).

Se ha señalado que la alta predisposición de reactividad cruzada entre LC y EChagas se debe principalmente a que ambas especies de tripanosomátidos (*Leishmania* spp y *Trypanosoma* spp), por ser especies filogenéticamente muy cercanas, presentan estructuras muy similares, tales como glicoproteínas (que contienen galactosil), proteínas del citoesqueleto (tubulina) y proteínas capaces de unirse a ácidos grasos (fatty acid binding proteins) (78). No obstante, la técnica TESA-Blot ha sido ampliamente estudiada como técnica de diagnóstico confirmatoria para la enfermedad de Chagas; ésto debido a las elevadas proporciones estadísticas de rendimiento (PER) alcanzadas y sobre todo por la especificidad analítica elevada frente a *Leishmania* spp en comparación con otras técnicas de serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas (64, 65, 78, 79).

La capacidad predictiva diagnóstica del test M2N–ELISA (*apartado 3.3.3*) reveló ser significativa y puede relacionar la presencia/ausencia de anticuerpos anti-

Leishmania (enfocado en *L. braziliensis*) al estatus de infección esperado (positivo/negativo) de los casos analizados con una probabilidad del 99.17%. Durante la estimación de las PER (mediante el IY) se mantuvo un mismo valor estimado de especificidad diagnóstica primaria del 95.74%. Ésto debido a que la selección de los valores de PER se enfocó en mejorar la sensibilidad diagnóstica primaria puesto que el parásito de *Leishmania* spp induce una respuesta inmunológica predominante de tipo celular en la forma clínica cutánea de la enfermedad causando que los títulos de anticuerpos circulantes en suero/plasma sean bajos en comparación con las formas clínicas mucosa y visceral.

En la Tabla N° 15 se aprecia que los valores de sensibilidad diagnóstica primaria estimados (en términos de PP) para el test ASTL–ELISA (88.89%) fueron menores que los valores de sensibilidad diagnóstica primaria estimados para el test M2N–ELISA (de 94.44%). Por lo tanto, se asume que un posterior análisis más robusto en muestras de suero/plasma mostrará una diferencia más acentuada en la sensibilidad diagnóstica primaria entre ambos test de ELISA.

Además, el modelo predictivo combinado de ambos test de ELISA logró relacionar la presencia/ausencia de anticuerpo anti-*Leishmania* (enfocado en *L. braziliensis*) al estatus de infección esperado (positivo/negativo) de los casos analizados con una probabilidad del 99.70%. Este valor es mayor que los test de ELISA por separado (99.17% para el test M2N–ELISA y de 97.34% para el test ASTL–ELISA). Tales resultados muestran que los test combinados podrían ser potencialmente útiles como método de diagnóstico para LCA.

En el presente estudio no se pudo determinar la eficacia del test M2N–ELISA en comparación con las pruebas de diagnóstico convencional para LCA. Se

evaluaron muestras de suero/plasma de pacientes con diagnóstico de LCA confirmado por pruebas parasitológicas (cultivo, frotis directo) y/o moleculares (PCR). Debido a que los resultados de algunas de estas pruebas no estuvieron disponibles para todos los pacientes, solo pudimos comparar el desempeño diagnóstico del antígeno multiepitópico M2N con el antígeno tradicional ASTL en el formato de test de ELISA indirecto.

Si bien la técnica serológica de ELISA presenta importantes ventajas (*apartado 1.3.3.1*), el test M2N–ELISA aquí desarrollado presenta algunas limitantes, tales como:

- El test M2N–ELISA no podría ser aún empleado en campo (zonas endémicas para LCA) puesto que aún no se ha efectuado la validación diagnóstica del test en el laboratorio de un hospital de referencia (y posteriormente en campo) con una mayor cantidad de muestras de suero de individuos procedentes de las zonas endémicas.
- El test M2N–ELISA solo podría ser adaptado a laboratorios de referencia, los cuales aún se encuentran alejados de las zonas endémicas para LCA. Ésto debido a que los resultados están reportados en términos de AR; y aunque tales resultados han alcanzado una precisión analítica global (reproducibilidad intra e inter-ensayo) debajo del 10%, requieren de un control de calidad analítico frecuente para vigilar que las desviaciones en la precisión analítica no superen el umbral permitido y no incumplan las reglas de control de Westgard (*apartado 2.2.6*). No obstante, también se han mostrado los resultados en términos de PP, aunque ésto solo se ha realizado con el único propósito de ajustar los resultados de AR a un

rango porcentual (0% a 100%) para permitir el análisis de la regresión logística binaria del test diagnóstico. Para futuros trabajos de investigación será necesario disponer de sueros **patrones positivos** (fuerte y débil) elaborados de manera más rigurosa, con lo cual se podrá trasladar la validez analítica del test M2N–ELISA (estimada en este trabajo) a laboratorios de infraestructura más sencilla, propia de las zonas endémicas de LCA. El laboratorio de referencia solo se ocuparía del control de calidad y la elaboración, de ser posible, de los patrones positivos.

A nivel global, los resultados de la evaluación de la proteína multiepitópica M2N, en un formato de ELISA indirecto, evidenciaron su validez analítica para la detección de anticuerpos enfocados en *L. braziliensis* (en muestras de plasma de pacientes con diagnóstico confirmado para LCA) y en la diferenciación como “negativos” de sueros de individuos sanos sin historial clínico de LCA así como de sueros de pacientes con diagnóstico confirmado para la enfermedad de Chagas. Los resultados alcanzados en el presente trabajo de investigación son promisorios. Se requiere de futuros estudios de validación diagnóstica empleando muestras de suero de poblaciones muestrales más grandes provenientes de diferentes regiones endémicas para LCA.

Si bien el test M2N–ELISA está enfocado para la detección de anticuerpos anti-*L. braziliensis* (puesto que la predicción bioinformática de los epítopes conformantes de la proteína M2N partió de dicha especie); potencialmente también podría detectar anticuerpos contra antígenos derivados de otras especies

causantes de LCA, puesto que un paso de la predicción bioinformática se ocupó del análisis de conservación de las secuencias epitópicas entre especies de *Leishmania (Viannia)* (apartado 1.3.5). Adicionalmente, los epítopes conformantes de la proteína recombinante M2N pueden ser evaluados de manera individual, junto con otros epítopes candidatos potenciales (derivados de aproximaciones de inmunoinformática y/o confirmados experimentalmente de ser epítopes inmunodominantes de *Leishmania braziliensis*), para estimar su valor diagnóstico y de esta manera poder construir proteínas multiepitópicas optimizadas con una combinación más eficiente de epítopes.

Por otra parte, con el propósito de desarrollar un test de diagnóstico rápido (RDT), que pueda estar accesible y sea asequible en el punto de atención de pacientes (“point-of-care” - POC) en áreas endémicas, la nueva proteína recombinante M2N puede evaluarse (en estudios posteriores) en otros formatos de inmunoensayo más simples y de menor costo, como son las tiras de inmunocromatografía. Prototipos de RDTs para uso en POC han sido desarrollados y evaluados principalmente para LV (80, 81). Recientemente, se ha descrito el primer test molecular con aplicación POC para especies de *Leishmania (Viannia)* causantes de LC y LM (82).

V. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación muestran que la proteína multiepitópica recombinante M2N puede reemplazar al ASTL en el sero-diagnóstico de LCA humana con valores de sensibilidad y especificidad comparables entre ambos cuando son usados en un formato de ELISA indirecto.
2. La tendencia hacia una mayor sensibilidad para el sero-diagnóstico de LCA y la ausencia de reactividad cruzada (para la enfermedad de Chagas) del test M2N–ELISA son resultados prometedores que pueden impulsar evaluaciones posteriores de la proteína M2N en poblaciones muestrales más grandes en diferentes regiones endémicas para LCA.
3. La proteína recombinante M2N en un formato de ELISA indirecto ha mostrado tener una precisión consistente en el análisis de muestras de suero/plasma. Tal resultado respalda la calidad analítica de la prueba para posteriores evaluaciones de la proteína M2N en otros formatos de diagnóstico.
4. En conjunto, los resultados globales del presente trabajo de investigación muestran que la aplicación de proteínas recombinantes multiepitópicas como herramientas de detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en un formato de ELISA indirecto es recomendada para el sero-diagnóstico de LCA.

VI. RECOMENDACIONES

1. Es importante evaluar el test M2N–ELISA con una mayor cantidad de muestras de suero provenientes de distintas zonas endémicas de LCA, con el propósito de realizar la validación diagnóstica.
2. Evaluar la reactividad cruzada del test M2N–ELISA ensayando un número mayor de muestras de suero y de diferentes co-infecciones/enfermedades concurrentes con LCA, tales como malaria, VIH o tuberculosis.
3. Evaluar la capacidad del test M2N–ELISA de detectar anticuerpos anti-*Leishmania* en muestras provenientes de pacientes con leishmaniosis mucosa y visceral. Si bien LV no es endémica en Perú, sí lo es en países vecinos como Brasil.
4. Evaluar la aplicación diagnóstica de la proteína M2N en otros formatos de sero-diagnóstico, tales como Western-blot o inmunocromatografía. Este último es de especial interés con el propósito de desarrollar un test diagnóstico simple, rápido y de bajo costo, que pueda ser dispuesto en el punto de atención de pacientes (POC).
5. Evaluar el desempeño diagnóstico de los 9 epítopes conformantes de la proteína M2N por separado, junto con epítopes candidatos adicionales derivados de enfoques de inmunoinformática, en el formato de ELISA indirecto. Ello permitirá identificar la combinación más eficiente de epítopes para ser evaluados como antígenos multiepitópicos con potencial para la mejora del inmunodiagnóstico de leishmaniosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8:419-433.
2. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7:e35671.
3. Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007 Jun 15;195(12):1846-51.
4. Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, Lazo M, De Doncker S, Boelaert M, Robays J, Dujardin JC, Arevalo J, Chappuis F. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis.* 2008 Jan 15;46(2):223-31. doi: 10.1086/524042.
5. Ríos JM, Yuil de Ríos E. Métodos diagnósticos parasitológicos, inmunológicos, histopatológicos y moleculares de Leishmaniasis cutánea. *Rev méd cient.* 2010;23:45-60.
6. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* 2004;119:238-258.
7. World Health Organization-TRS. Control of the Leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 22–26 March 2010.
8. Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine.* 2008; 25;26: 1709-1724.
9. Isaza DM, Restrepo M, Mosca W. Immunoblot analysis of *Leishmania panamensis* antigens in sera of patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1997;35:3043-3047

10. *Silvestre R, Santarém N, Teixeira L, Cunha J, Schallig H, Cordeiro-da-Silva A.* Evaluation of *Leishmania* species reactivity in human serologic diagnosis of leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;81:202-208.
11. *Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2009;13:47-52.
12. *Celeste BJ, Arroyo Sanchez MC, Ramos-Sanchez EM, Castro LGM, Lima Costa FA, Goto H.* Recombinant *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Cutaneous, Mucosal, and Visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 2014;90(5):860-865. doi:10.4269/ajtmh.13-0623.
13. *Skraba CM, Pedroso RB, Fiorini A, Rosado FR, Aristides SM, Lonardoni MV, Teixeira JJ, Silveira TG.* Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 Apr;78(4):411-7. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.020.
14. *Al-Nahhas SA.* Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Syrian Arab Republic. *Saudi Med J.* 2009 Mar;30(3):382-6.
15. *Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, Belli A, Favoreto Júnior S, Ferreira MS.* Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 Mar-Apr;41(2):135-41.
16. *Yoneyama KA, de Peder LD, Lonardoni MV, Silveira TG.* Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Paraná State, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2007 Jun;11(3):360-4.
17. *Zeyrek FY, Korkmaz M, Ozbel Y.* Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania tropica* in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL Is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Nov;14(11):1409-15. Epub 2007 Aug 29.

18. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):1037-43.
19. Mosleh IM, Saliba EK, al-Khateeb MS, Bisharat Z, Oumeish OY, Bitar W. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis in Jordan using indirect fluorescent antibody test and the enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Trop.* 1995 May;59(2):163-72.
20. Roffi J, Dedet JP, Desjeux P, Garré MT. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Am J Trop Med Hyg.* 1980 Mar;29(2):183-9.
21. Costa MM, Penido M, dos Santos MS, Doro D, de Freitas E, Michalick MS, Grimaldi G, Gazzinelli RT, Fernandes AP. Improved canine and human visceral leishmaniasis immunodiagnosis using combinations of synthetic peptides in enzyme-linked immunosorbent assay. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1622.
22. Faria AR, Costa MM, Giusta MS, Grimaldi G Jr, Penido ML, Gazzinelli RT, Andrade HM. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1310.
23. Faria AR, de Castro Veloso L, Coura-Vital W, Reis AB, Damasceno LM, Gazzinelli RT, Andrade HM. Novel recombinant multi-epitope proteins for the diagnosis of asymptomatic *Leishmania infantum*-infected dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 8;9:e3429.
24. Karosiene E, Rasmussen M, Blicher T, Lund O, Buus S, Nielsen M. NetMHCIIpan-3.0, a common pan-specific MHC class II prediction method including all three human MHC class II isotypes, HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ. *Immunogenetics.* 2013 Oct;65(10):711-24. doi: 10.1007/s00251-013-0720-y. Epub 2013 Jul 31.
25. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(Database issue):D913-9. doi: 10.1093/nar/gkq1128.

26. Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio MF, Appella E, Hoffman S, Kubo RT, Chesnut RW, Grey HM, Sette A. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol*. 1998 Apr 1;160(7):3363-73.
27. Singh H, Ansari HR, Raghava GP. Improved method for linear B-cell epitope prediction using antigen's primary sequence. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5):e62216.
28. Dai J, Jiang M, Wang Y, Qu L, Gong R, Si J. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19:338-342.
29. Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath R, Ito L, Oyafuso LK, Manini MI, Balagon MV, Tan EV, Saunderson PR, Reed SG, Carter D. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17:298-303.
30. Ferreira AW, Belem ZR, Lemos EA, Reed SG, Campos-Neto A. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *J Clin Microbiol*. 2001;39: 4390-4395.
31. AnandaRao R, Swaminathan S, Fernando S, Jana AM, Khanna N. A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent. *Protein Expr Purif*. 2005 May;41:136-147.
32. Menezes-Souza D, Mendes TA, Gomes Mde S, Bartholomeu DC, Fujiwara RT. 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*. 2015 Jan 8;9(1):e3426. doi: 10.1371/journal.pntd.0003426. eCollection 2015 Jan.
33. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003 Nov;19(11):502-8. Review.
34. Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*. 2008 Apr;118(4):1301-10. doi: 10.1172/JCI33945.
35. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999 Oct 2;354(9185):1191-9.

36. *Cabrera R.* Análisis y tendencia de la leishmaniosis en el Perú, 2000 - 2011. *Bol Epidemiol. (Lima).* 2011; 20 (52): 1098 - 1099.
37. *DGE.* Resumen de las enfermedades o eventos bajo vigilancia epidemiológica en el Perú, del 04 de Enero del 2004 al 12 de Marzo del 2016. *Bol Epidemiol (Lima).* Del 2004; 13 (52) al 2016; 25 (10).
38. *Cabrera R, Nayhua L.* Análisis y tendencias de la leishmaniasis, en el Perú, 2012. (Hasta la SE. N° 52 2012). *Bol Epidemiol (Lima).* 2012; 21 (52): 885 – 888.
39. *OMS.* Control de la Leishmaniosis. Serie de Informes Técnicos; 949. Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010.
40. *Chamakh-Ayari R, Bras-Gonçalves R, Bahi-Jaber N, Petitdidier E, Markikou-Ouni W, Aoun K, Moreno J, Carrillo E, Salotra P, Kaushal H, Negi NS, Arevalo J, Falconi-Agapito F, Privat A, Cruz M, Pagniez J, Papierok GM, Rhouma FB, Torres P, Lemesre JL, Chenik M, Meddeb-Garnaoui A.* *In vitro* evaluation of a soluble *Leishmania* promastigote surface antigen as a potential vaccine candidate against human leishmaniasis. *PLoS One.* 2014 May 2;9(5):e92708. doi:10.1371/journal.pone.0092708.
41. *Jensen AT, Gaafar A, Ismail A, Christensen CB, Kemp M, Hassan AM, Kharazmi A, Theander TG.* Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Nov;55(5):490-5.
42. *Crowter JR.* The ELISA Guidebook. *Methods in Molecular Biology Series*; 2 Ed.; Humana Press; 2009
43. *Jacobson RH.* Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech.* 1998 Aug;17(2):469-526. Review. English, French, Spanish.
44. *Cuervo P, De Jesus JB, Saboia-Vahia L, Mendonça-Lima L, Domont GB, Cupolillo E.* Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. *J Proteomics.* 2009; 2;73:79-92.
45. *Hajian-Tilaki K.* Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *J Biomed Inform.* 2014 Apr;48:193-204. doi:10.1016/j.jbi.2014.02.013.

46. *Veland N, Boggild AK, Valencia C, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Van der Auwera G, Dujardin JC, Arevalo J. Leishmania (Viannia) species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: assessment of a molecular stepwise approach. J Clin Microbiol. 2012 Feb;50(2):495-8. doi: 10.1128/JCM.05061-11.*
47. *Casali N, Preston A. E. coli Plasmid Vectors – Method and Applications. Methods in Molecular Biology Series; 1st Ed.; Humana Press. 2003*
48. *Wirth R, Friesenegger A, Fiedler S. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. Mol Gen Genet. 1989 Mar;216(1):175-7.*
49. *Sambrook J; Russel D. Molecular Cloning – A Laboratory Manual; 1 Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.*
50. *Balbás P. and Lorence A. Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 267. 2nd Ed; Humana Press Inc., Totowa, NJ 2004.*
51. *Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discov Today. 2014 May;19(5):590-601. doi: 10.1016/j.drudis.2013.11.008. Epub 2013 Nov 15.*
52. *Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Frontiers in Microbiology. 2014;5:172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172.*
53. *Sivashanmugam A, Murray V, Cui C, Zhang Y, Wang J, Li Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Protein Sci. 2009 May;18(5):936-48. doi: 10.1002/pro.102.*
54. *Hochuli E, Döbeli H, Schacher A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. J Chromatogr. 1987 Dec 18;411:177-84.*
55. *Coligan JE, Speicher DW, Wingfield PT. Current Protocols in Protein Science by John Wiley & Sons, Inc.; Edt. Board. 2003*

56. *Bonifacino JS., Dasso M, Harford JB., Lippincott-Schwartz J, Yamada KM.* Current Protocols in Cell Biology by John Wiley & Sons, Inc.; Edt. Board. 2003
57. *Overall CM.* A microtechnique for dialysis of small volume solutions with quantitative recoveries. *Anal Biochem.* 1987 Aug 15;165(1):208-14.
58. *Fawcett JK, Scott JE.* A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of Clinical Pathology.* 1960;13(2):156-159.
59. *Boissel JP, Le Bonniec B, Rabiet MJ, Labie D, Elion J.* Covalent structures of beta and gamma autolytic derivatives of human alpha-thrombin. *J Biol Chem.* 1984 May 10;259(9):5691-7.
60. *Amersham pharmacia biotech.* The recombinant Protein Handbook. Protein amplification and simple purification. 18-1142-75. Edition AB.
61. *Holleman WH, Andres WW, Weiss LJ.* The relationship between the lysine and the p-aminobenzamidine binding sites on human plasminogen. *Thromb Res.* 1975 Nov;7(5):683-93.
62. *Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EM, Lelenta M, Jeggo MH.* Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech.* 1993 Jun;12(2):435-50.
63. *Corredor A, López M, Duque S, Gualdrón L, Tesh R.* Estandarización y evaluación de ELISA para el serodiagnóstico de Leishmaniasis cutánea. *Biomédica.* 1995; 15(2):83-8. doi:<http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v15i2.863>
64. *Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, Fiscella M, Gorovits B, Kirschner S, Moxness M, Parish T, Quarmby V, Smith H, Smith W, Zuckerman LA, Koren E.* Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Dec 15;48(5):1267-81. doi: 10.1016/j.jpba.2008.09.020. Epub 2008 Sep 19.
65. *Nakazawa M, Rosa DS, Pereira VR, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, Barros MN, Abath FG, Gomes YM.* Excretory-secretory antigens of *Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 Sep;8(5):1024-7.

66. Umezawa ES, Silveira JF. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:285-8.
67. Cox, D. The Regression Analysis of Binary Sequences. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), (1958) 20(2), 215-242. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2983890>.
68. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. Cancer. 1950 Jan;3(1):32-5.
69. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. Clin Chem. 1981 Mar;27(3):493-501.
70. Farahmand M, Nahrevanian H. Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. Iran Biomed J. 2016 Feb 17. pii: Pii-IBJ-A-10-57-1.
71. Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, Skeiky YA, Leiby DA, Badaro R, Reed SG. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. J Infect Dis. 1999 May;179(5):1226-34.
72. Houghton RL, Benson DR, Reynolds L, McNeill P, Sleath P, Lodes M, Skeiky YA, Badaro R, Krettli AU, Reed SG. Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. J Infect Dis. 2000 Jan;181(1):325-30.
73. Tripathi NK, Shrivastva A, Pattnaik P, Parida M, Dash PK, Jana AM, Rao PV. Production, purification and characterization of recombinant dengue multiepitope protein. Biotechnol Appl Biochem. 2007 Feb;46(Pt 2):105-13.
74. Camussone C, Gonzalez V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS. Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. Clin Vaccine Immunol. 2009 Jun;16(6):899-905. doi: 10.1128/CVI.00005-09.
75. Tripathi NK, Shrivastva A, Pattnaik P, Parida M, Dash PK, Gupta N, Jana AM, Rao PV. Production of IgM specific recombinant dengue multiepitope

protein for early diagnosis of dengue infection. *Biotechnol Prog.* 2007 Mar-Apr;23(2):488-93. Epub 2007 Jan 27.

76. *AnandaRao R, Swaminathan S, Fernando S, Jana AM, Khanna N.* Recombinant Multiepitope Protein for Early Detection of Dengue Infections. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2006;13(1):59-67. doi:10.1128/CVI.13.1.59-67.2006.
77. *Hajissa K, Zakaria R, Suppian R, Mohamed Z.* Design and evaluation of a recombinant multi-epitope antigen for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Parasit Vectors.* 2015 Jun 11;8:315. doi:10.1186/s13071-015-0932-0.
78. *Galdino AS, Santos JC, Souza MQ, Nóbrega YKM, Xavier M-AE, Felipe MSS, Freitas SM, Torres FAG.* A Novel Structurally Stable Multiepitope Protein for Detection of HCV. *Hepatitis Research and Treatment.* 2016, Article ID 6592143, 9 pages, Vol. 2016. doi:10.1155/2016/6592143.
79. *Berrizbeitia M.* Antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (tesa) como herramientas útiles para el diagnóstico de la enfermedad de chagas. *Saber .* 2013 Dic;25(4): 346-357.
80. *Escalante H, Jara C, Davelois K, Iglesias M, Benites A, Espinoza E.* Estandarización de la técnica de Western Blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2014;31(4):644-51.
81. *Bezuneh A, Mukhtar M, Abdoun A, Teferi T, Takele Y, Diro E, Jemaneh A, Shiferaw W, Wondimu H, Bhatia A, Howard RF, Ghalib H, Ireton GC, Hailu A, Reed SG.* Comparison of point-of-care tests for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis in East African patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Dec;91(6):1109-15. doi: 10.4269/ajtmh.13-0759.
82. *Mukhtar M, Abdoun A, Ahmed AE, Ghalib H, Reed SG, Boelaert M, Menten J, Khair MM, Howard RF.* Diagnostic accuracy of rK28-based immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis: a prospective clinical cohort study in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015 Sep;109(9):594-600. doi:10.1093/trstmh/trv060.

83. Saldarriaga OA, Castellanos-Gonzalez A, Porrozzi R, Baldeviano GC, Lescano AG, de Los Santos MB, Fernandez OL, Saravia NG, Costa E, Melby PC, Travi BL. An Innovative Field-Applicable Molecular Test to Diagnose Cutaneous *Leishmania Viannia* spp. *Infections*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Apr 26;10(4):e0004638. doi: 10.1371/journal.pntd.0004638.

ANEXOS

Anexo N° 01
Aprobación ética de la presente investigación



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología (DUICT)

CONSTANCIA 541-24-15

El Presidente del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : "Desarrollo y validación analítica de una técnica de ELISA indirecto basada en una proteína multiepitópica para el diagnóstico de leishmaniosis cutánea"

Código de inscripción : 64642

Investigador principal : Gerson Córdova Serrano

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación**, versión 4.0 de fecha 04 de noviembre 2015.
2. **Consentimiento informado para individuos sanos**, versión 3.0 de fecha 12 de noviembre 2015.
3. **Consentimiento informado para autorización de uso de muestras (reconsentimiento)**, versión 3.0 de fecha 04 de noviembre 2015.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **15 de noviembre del 2016**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 16 de noviembre del 2015



Dra. Frine Samalvides Cuba
Presidenta

Comité Institucional de Ética en Investigación



/s/pr

Anexo N° 02: Protocolo ELISA N°01.

Se colocan 100 μL de antígeno disuelto en buffer de “*coating*”. El antígeno es adsorbido en la superficie de los pozos de las placas multipocillo durante toda la noche (O/N) a 4°C. Se sacude el antígeno sobrante y se lava la placa de manera manual (3 veces con 200 μL de PBS por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añaden 200 μL de buffer de bloqueo para cubrir la superficie de los pozos que no ha cubierto el antígeno con proteína de baja unión inespecífica. Se deja bloqueando a temperatura ambiente por 2 horas. Se sacude la solución de bloqueo y se lava la placa de manera manual (3 veces con 200 μL de PBS por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añade 100 μL de una dilución del anticuerpo primario (por ejemplo 1:200 y 1:400 para suero y plasma, respectivamente). Se deja incubando por hora y media a temperatura ambiente con/sin agitación constante a 300 o 450 rpm en un shaker. Se sacude la dilución de anticuerpo primario y se lava la placa de manera manual (3 veces con 200 μL de PBS por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añade 100 μL de una dilución del anticuerpo secundario (efectiva desde 1:2000 hasta 1:5000 para muestras de suero o plasma). Se deja incubando por 1 hora a temperatura ambiente con/sin agitación constante a 300 o 450 rpm en un shaker. Se sacude la dilución de anticuerpo secundario y se lava la placa de manera manual (4 veces con 200 μL de PBS-Tween 0.1% por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se coloca la placa en un lugar protegido de la luz (empleando cubiertas de papel aluminio, plástico y apagando parcialmente las

luces del ambiente de trabajo). Se añaden 100µL de sustrato TMB por pocillo y se deja incubando a temperatura ambiente por 3 a 5 min (variable, depende de las intensidades de color azul que se observen). Es necesario que tanto la placa como el sustrato TMB estén protegidos de la luz. Se detiene la reacción con 50 µL de ácido sulfúrico 1M. El color debe pasar de azul a amarillo. Se lee la DO de la solución en cada pocillo de la placa empleando un lector de ELISA con las longitudes de onda de 450 nm a 650 nm.

Anexo N° 03: Protocolo ELISA N°02.

Se colocan 100 µL de antígeno (la concentración mínima efectiva es de 10 µg/mL) disuelto en buffer de carbonato/bicarbonato pH 9.6. El antígeno es adsorbido en la superficie de los pozos de las placas multipocillo durante toda la noche (O/N) a 4°C. Se sacude el antígeno sobrante y se lava la placa de manera manual (5 veces con 200 µL de PBS-T 0.1% por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añade 200 µL de buffer de bloqueo para cubrir la superficie de los pozos que no ha cubierto el antígeno con proteína de baja unión inespecífica. Se deja bloqueando a temperatura ambiente por 3 horas. Se sacude la solución de bloqueo y se lava la placa de manera manual (5 veces con 200 µL de PBS-T 0.1% por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añaden 100 µL de una dilución en PBS del anticuerpo primario (efectiva desde 1:200 hasta 1:800 para muestras de suero o plasma). Se deja incubando por 3 horas a 37°C con agitación constante a 300 o 450 rpm en un shaker. Se sacude la dilución de anticuerpo primario y se lava la placa de manera manual (5 veces con 200 µL de PBS-T 0.1% por pocillo) o se

emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añaden 100 μL de una dilución en PBS del anticuerpo secundario (efectiva desde 1:2000 hasta 1:5000 para muestras de suero o plasma). Se deja incubando por 2 horas a 37°C con agitación constante a 300 o 450 rpm en un shaker. Se sacude la dilución de anticuerpo secundario y se lava la placa de manera manual (5 veces con 200 μL de PBS-T 0.1% por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se coloca la placa en un lugar protegido de la luz (empleando cubiertas de papel aluminio, plástico y apagando parcialmente las luces del ambiente de trabajo). Se añaden 100 μL de sustrato TMB por pocillo y se deja incubando a temperatura ambiente por 3 a 5 min (variable, depende de las intensidades de color azul que se observen). Es necesario que tanto la placa como el sustrato TMB estén protegidos de la luz. Se detiene la reacción con 50 μL de ácido sulfúrico 1M. El color debe pasar de azul a amarillo. Se lee la DO de la solución en cada pocillo de la placa empleando un lector de ELISA con las longitudes de onda de 450 nm a 650 nm.

Anexo N° 04: Protocolo optimizado ELISA N°03.

Se colocan 100 μL de antígeno (la concentración mínima efectiva es de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disuelto en buffer de carbonato/bicarbonato pH 9.6. El antígeno es adsorbido en la superficie de los pozos de las placas multipocillo durante toda la noche (O/N) a 4°C. Se sacude el antígeno sobrante y se lava la placa de manera manual (5 veces con 200 μL de PBS-T 0.1% por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añaden 200 μL de MPBS 5% (leche comercial en polvo Anchor®) para bloquear la superficie de los pozos que no ha

cubierto el antígeno. Se deja bloqueando a temperatura ambiente por 3 horas. Se sacude la solución de bloqueo y se lava la placa de manera manual (5 veces con 200 μ L de PBS-T 0.1% por pocillo) o empleando un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añaden 100 μ L de una dilución en PBS del anticuerpo primario (efectiva desde 1:200 hasta 1:800 para muestras de suero o plasma). Se deja incubando por 3 horas a 37°C con agitación constante a 300 o 450 rpm en un shaker. Se sacude la dilución de anticuerpo primario y se lava la placa de manera manual (5 veces con 200 μ L de PBS-T 0.1% por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se añaden 100 μ L de una dilución en PBS del anticuerpo secundario (efectiva desde 1:2000 hasta 1:5000 para muestras de suero o plasma). Se deja incubando por 2 horas a 37°C con agitación constante a 300 o 450 rpm en un shaker. Se sacude la dilución de anticuerpo secundario y se lava la placa de manera manual (5 veces con 200 μ L de PBS-T 0.1% por pocillo) o se emplea un lavador de placas de ELISA con el mismo buffer. Se coloca la placa en un lugar protegido de la luz (empleando cubiertas de papel aluminio, plástico y apagando parcialmente las luces del ambiente de trabajo). Se añade 100 μ L de sustrato TMB por pocillo y se deja incubando a temperatura ambiente por 3 a 5 min (variable, depende de las intensidades de color azul que se observen). Es necesario que tanto la placa como el sustrato TMB estén protegidos de la luz. Se detiene la reacción con 50 μ L de ácido sulfúrico 1M. El color debe pasar de azul a amarillo. Se lee la DO de la solución en los pocillos de la placa empleando un lector de ELISA con las longitudes de onda de 450 nm a 650 nm.

Anexo N° 05
Gráficas de Levey-Jennings en los ensayos de
precisión del test M2N-ELISA.

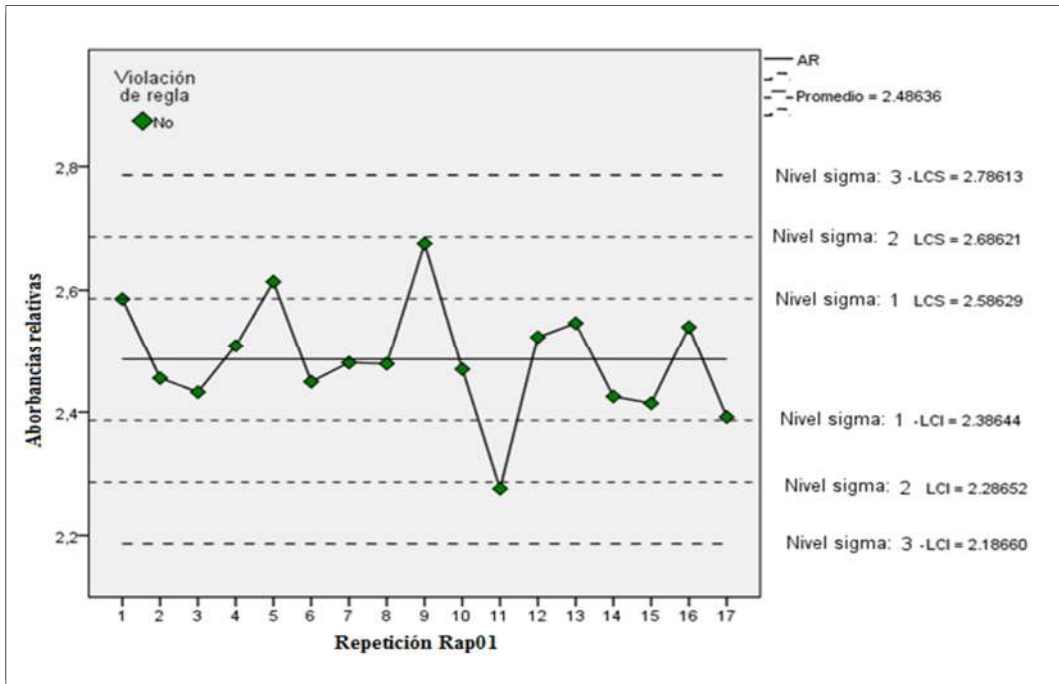


Figura N° 26. Gráfica de Levey-Jennings del proceso analítico de evaluación de la muestra Rap01 diecisiete veces en una misma placa empleando el test M2N-ELISA.

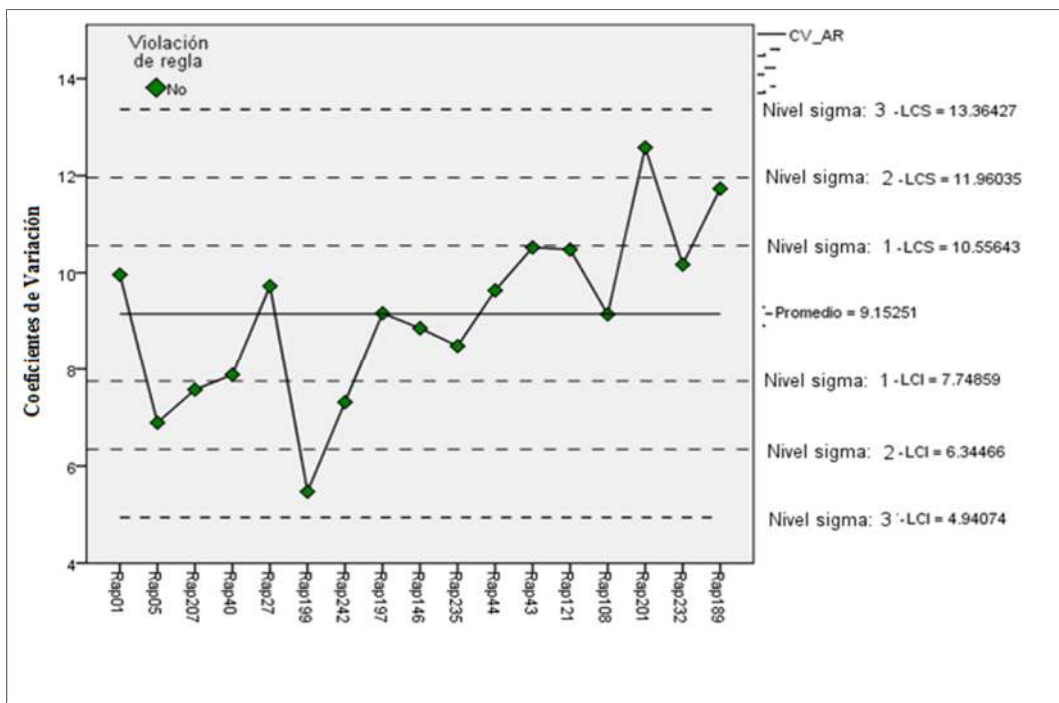


Figura N° 27. Gráfica de Levey-Jennings del proceso analítico de evaluación de diecisiete muestras positivas en tres placas en un día empleando el test M2N-ELISA..

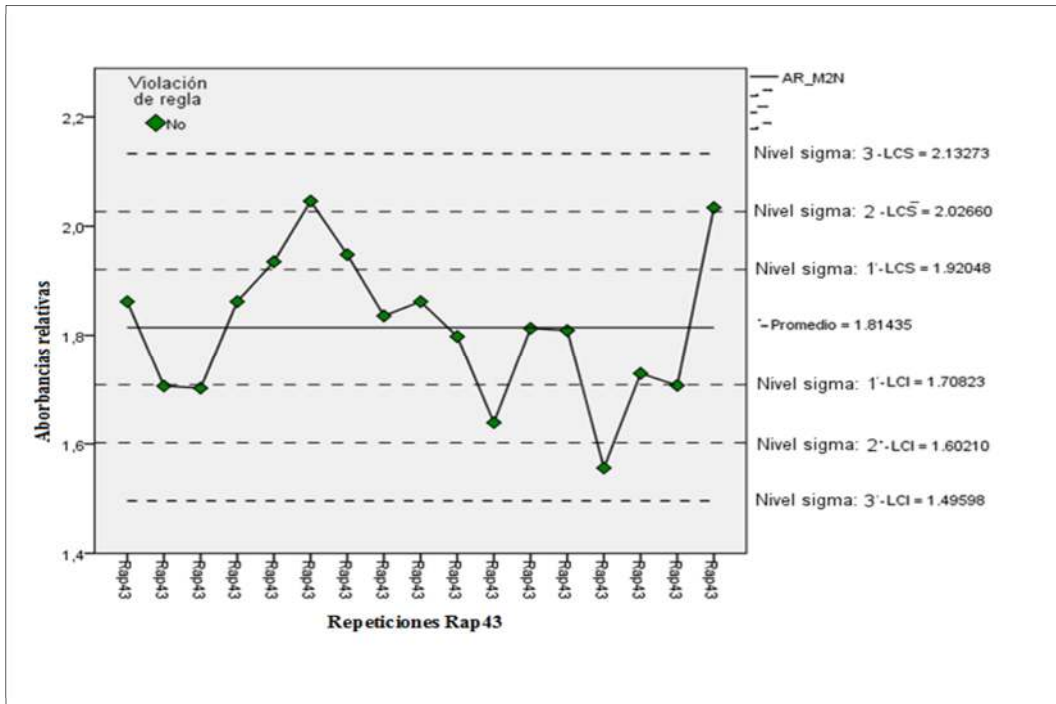


Figura N° 28. Gráfica de Levey-Jennings del proceso analítico de evaluación de la muestra Rap43 diecisiete veces en 17 días empleando el test M2N-ELISA.

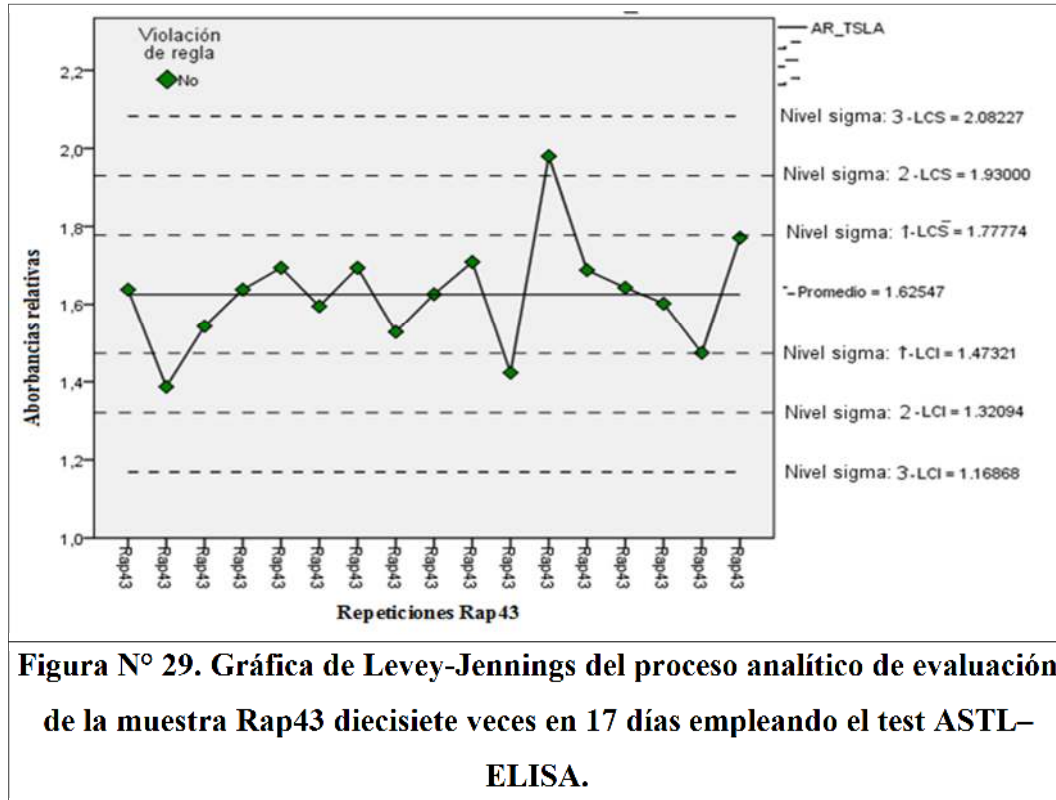


Figura N° 29. Gráfica de Levey-Jennings del proceso analítico de evaluación de la muestra Rap43 diecisiete veces en 17 días empleando el test ASTL-ELISA.

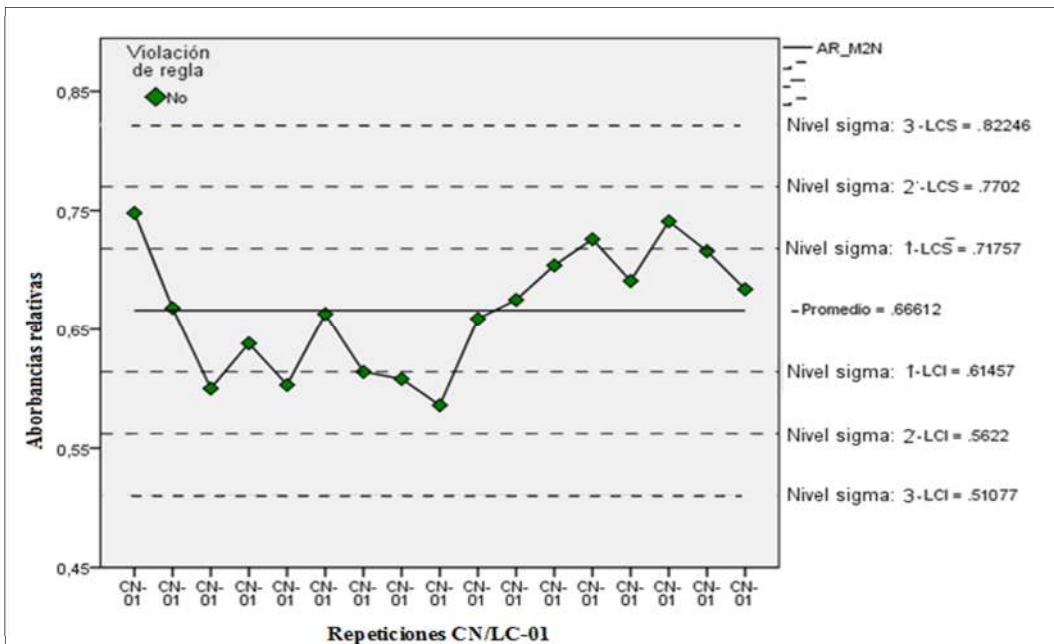


Figura N° 30. Gráfica de Levey-Jennings del proceso analítico de evaluación del suero CN/LC-01 diecisiete veces en 17 días empleando el test M2N-ELISA.

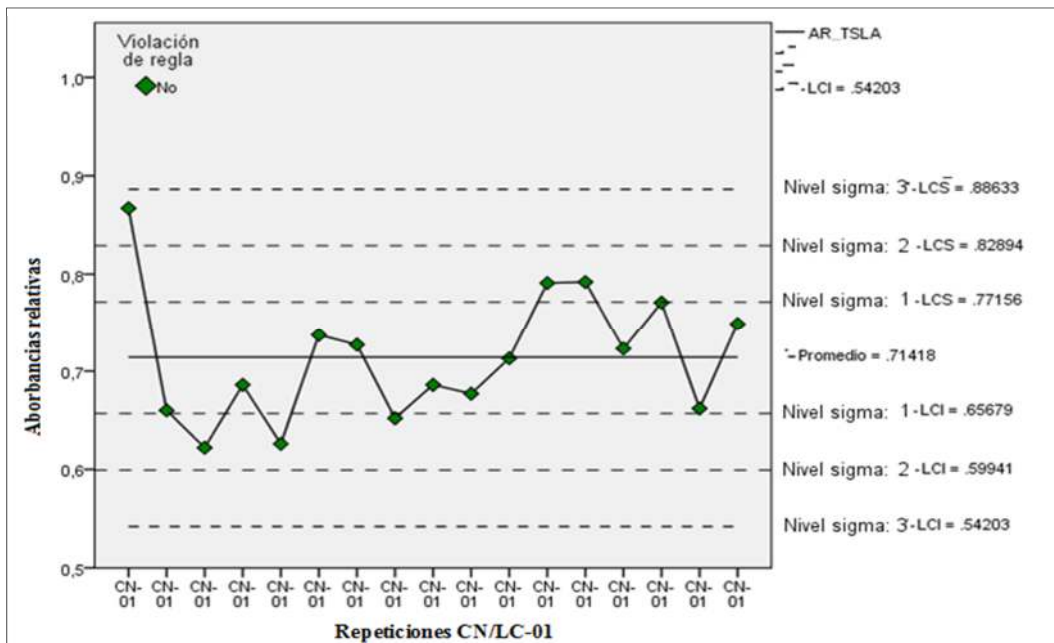


Figura N° 31. Gráfica de Levey-Jennings del proceso analítico de evaluación del suero CN/LC-01 diecisiete veces en 17 días empleando el test ASTL-ELISA.

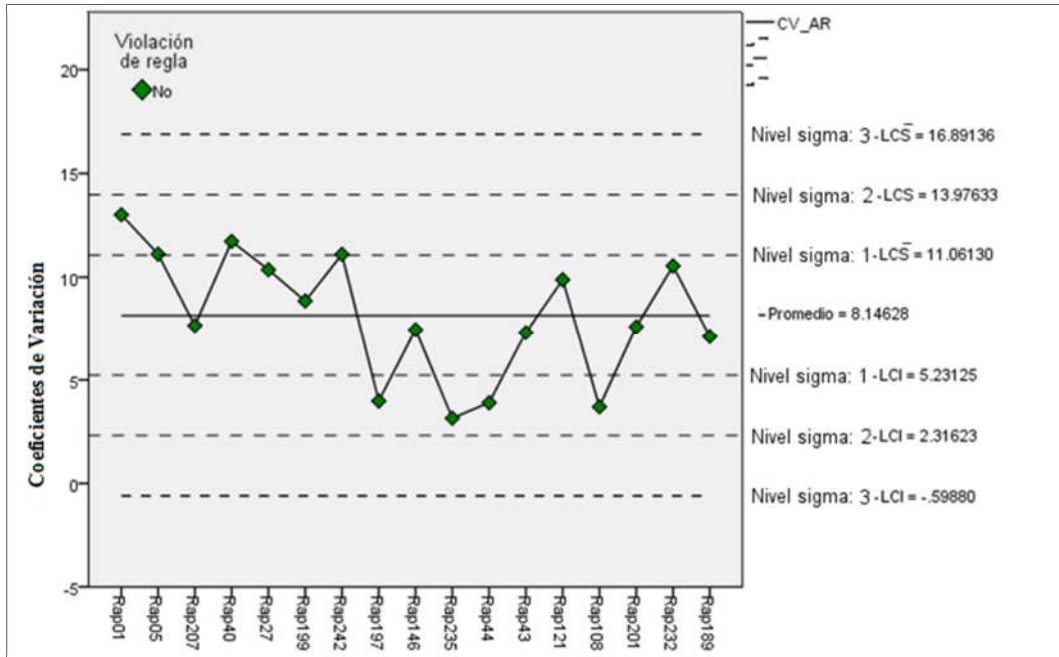


Figura N° 32. Gráfica de Levey-Jennings del proceso analítico de evaluación de diecisiete muestras positivas en tres placas en tres días empleando el test M2N-ELISA.