



36
29

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE ELISA PARA EL
DIAGNOSTICO DE LEISHMANIASIS Y COMPARACION CON
LA TECNICA DE IFI.**

FALLA DE ORIGEN

TESIS PROFESIONAL

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A N :

**ADRIANA HERNANDEZ REYES
MARCELA BARRON SOLIS**

**U N A M
F E S
Z A R A G O Z A**



**LO HUBIERO S.I.
DE HEREDIA SOLIZON**

MEXICO, D.F.

ABRIL 1995



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Marcos y Catalina

Con todo mi amor y agradecimiento. Porque gracias al amor, apoyo y confianza que siempre me han brindado. Han forjado mis logros que también son suyos.

A MIS HERMANOS

Porque siempre nos mantenemos unidos.

A MI ESPOSO

Héctor

Por toda tu ayuda, confianza y paciencia. Te amo.

A MIS HIJAS

Alejandra y Adriana

A ustedes lo mejor de mi vida, esperando que este trabajo sea para ustedes motivo de orgullo y las motive a superarse en la vida

A MIS PADRES

GLORIA Y RAFAEL

Quiénes siempre me han alentado a seguir adelante.

A MIS HERMANOS

Por su apoyo y cariño

AGRADECIMIENTOS

A NUESTROS ASESORES

Dr. Ruben Marroquín Segura
M.C Beatriz Rivas Sánchez

Por todas sus atenciones, ayuda y conocimientos

A Dr. Oscar Velasco Castrejón

Por las facilidades prestadas en la realización de este trabajo.

Q.F.B Jorge Floriani Verdujo.

Por todas sus valiosas aportaciones.

Q.F.B Yolanda Flores Cabrera

Q.F.B Jose Luis Mora Guevara

Q.F.B Marítha Patricia Orozco Gomez.

Por la contribucion en la realización de este trabajo.

De manera muy especial a mi amigo:

I.M.E Jorge Rubin Leyva

Por toda su valiosa ayuda.

INDICE

	<i>pag.</i>
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MARCO TEORICO	3
FUNDAMENTO	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
OBJETIVOS	24
HIPOTESIS	25
MATERIAL Y EQUIPO	26
METODOLOGIA	29
RESULTADOS	35
DISCUSION DE RESULTADOS	59
CONCLUSIONES	60
APENDICE	61
SUGERENCIAS	64
BIBLIOGRAFIA	65

RESUMEN

En la búsqueda métodos seguros y rápidos para el diagnóstico de leishmaniasis, y ya que generalmente la severidad de la enfermedad especialmente en la leishmaniasis diseminada y visceral, se relaciona con la oportunidad con que es confirmado el diagnóstico.

En el presente trabajo se realizó la estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Leishmaniasis, y un estudio observacional, prospectivo, transversal, y comparativo entre ésta técnica y la técnica de IFI. Se utilizaron sueros de pacientes con diversas manifestaciones de leishmaniasis provenientes de las zonas endémicas de la República Mexicana y sueros de personas que no han tenido contacto con el parásito.

El desarrollo experimental se llevo a cabo en las siguientes etapas:

ETAPA I.- Aislamiento y cultivo del antígeno, de una lesión Leishmaniasis en medio triple NNN y posteriormente cultivo en medio RPMI1640.

ETAPA II.- Corrimiento de los sueros problemas por la técnica de IFI.

ETAPA III.- Estandarización de la técnica de ELISA, utilizando varias diluciones de antígeno, conjugado y suero.

La técnica de ELISA quedó estandarizada de la siguiente forma concentración óptima de antígeno 8µg/ml, dilución del conjugado 1:1000 y dilución del suero 1:400.

Los resultados obtenidos muestran que no existe diferencia significativa entre el empleo de cualquiera de las cepas de Leishmania en la técnica de ELISA. Y además que existe diferencia significativa entre la técnica de ELISA e IFI para el diagnóstico de leishmaniasis, encontrándose mejores resultados en la técnica de ELISA.

Es recomendable buscar un antígeno específico para eliminar la reacción cruzada encontrada en el sistema.

INTRODUCCION

Se designa como Leishmaniasis a una serie de entidades clínicas que se manifiestan como lesiones ulcerosas de la piel que pueden o no curar espontáneamente: lesiones a mucosas, lesiones diseminadas incurables y, finalmente, lesiones viscerales que pueden llegar a ser fatales.

El agente etiológico es un protozoo del género *Leishmania* que necesita de dos huéspedes para completar su ciclo de vida; uno vertebrado en el cual el parásito es extracelular y presenta la forma de amastigote y el huésped invertebrado donde se presenta la forma de promastigote que es móvil.

Las Leishmaniasis constituyen una de las enfermedades tropicales de mayor importancia para la organización mundial de la salud; presentan distribución cosmopolita con la excepción de Australia, afectan a 12 millones de individuos, pertenecientes a 80 países, de los cuales enferman cada año alrededor de 400 mil y ponen en riesgo a más de 350 millones, incrementándose año con año el número de afectados.

Su importancia no solo radica en su creciente magnitud si no que también en su trascendencia, la cual es la medida por las consecuencias socioeconómicas y psicológicas que las caracteriza y por ser a menudo debilitantes e incapacitantes.

En México, durante los últimos tres años, las Leishmaniasis han incrementado su magnitud y pese a no realizarse investigación epidemiológica sistemática se han descubierto nuevos focos en Yucatán, Jalisco, Veracruz, Oaxaca y Quintana Roo, estados donde no se habían desarrollado.

Estas han sido responsabilizadas de proyectos de Neocolonización de tierras tropicales para el desarrollo agropecuario, del entorpecimiento de la construcción de obras viales en la selva, vías ferreas y carreteras. Además depauperan al campesino, al que con frecuencia incapacitan y hacen perder sus cosechas que, aunque muchas son de autoconsumo y su merma no afecta la producción nacional, a él lo sumen en la miseria.

Los parásitos del género *Leishmania* requieren de métodos seguros y rápidos para su diagnóstico, ya que generalmente la severidad de la enfermedad está relacionada con la oportunidad con que es confirmado el diagnóstico temprano y confirmatorio de la enfermedad para utilizar un tratamiento adecuado.

En este trabajo se estandarizó la técnica de ELISA para el diagnóstico de Leishmaniasis, y se realizó una comparación con la técnica de IFI encontrándose que existe una diferencia significativa entre el empleo de esta técnica y la de ELISA.

MARCO TEORICO

LEISHMANIASIS

DEFINICION: Las leishmaniasis son enfermedades parasitarias causadas por varias especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania*, que atacan la piel y víceras del hombre y de diversos animales. Son transmitidas por la picadura de la hembra de un pequeño mosquito pílso perteneciente a los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*.⁴⁸

AGENTE ETIOLOGICO

Las leishmaniasis son causadas por varias especies y subespecies de complejos de *Leishmania*, protozooario que no sólo parasita al hombre, sino también a mamíferos domésticos y silvestres. El género se divide en varias categorías taxonómicas tal y como se ilustra en el cuadro no.1. ^{33,49}

COMPLEJOS DE LEISHMANIA QUE AFECTAN AL HOMBRE

Cuadro No. 1

L C E D O I O M S N P H O L M V E A A J N N O I I A	<i>Leishmania amazonica</i>	-KALA-AZAR DE LA INDIA *OCASIONALMENTE LEISHMANIASIS CUTANEA DISSEMINADA POST-KALA AZAR	ADULTOS		<i>Phlebotomus argyropus</i>	INDIA, CHINA, SUMATRA, PAKISTAN, TAILANDIA.
	<i>Leishmania amazonica inficana</i>	KALA-AZAR INFANTIL	NIÑOS	PERROS	<i>Phlebotomus cruzi</i> <i>Phlebotomus nuttallii</i>	COSTAS DEL MEDITERRANEO Y ALGUNOS PAISES DE ASIA Y AFRICA
	<i>Leishmania amazonica chagasi</i>	LEISHMANIASIS VISCERAL EN AMERICA LEISHMANIASIS CUTANEA	NIÑOS Y ADULTOS	PERROS Y ZORROS	<i>Leishmania longicarpis</i>	ARGENTINA, BOLIVIA, BRASIL, COLOMBIA, GUATEMALA, MEXICO, EL SALVADOR, VENEZUELA, HONDURAS Y NICARAGUA.
L C E I T M S R P H O L M P E A I J N C O I A A	<i>Leishmania tropicis tropicis</i>	BOTON ORIENTE TIPO SECO	ADULTOS		<i>Phlebotomus papatasi, argyri</i>	COSTA DEL MEDITERRANEO, LIBIA, ARMENIA, AFGANISTAN, INDIA.
	<i>Leishmania tropicis mayor</i>	BOTON ORIENTE TIPO HUMEDO	ADULTOS	ROEDORES SILVESTRES	<i>Phlebotomus papatasi</i> (antropofílico)	ZONAS RURALES TIPO DESERTICO.
	<i>Leishmania antropofila</i>	LESIONES SEMEJANTES BOTON ORIENTE TIPO SECO PERO CON MAS LARGA DURACION Y LCD	ADULTOS	ROEDORES	<i>Phlebotomus indicus</i>	ETIOPIA Y KENIA
L C E M O I E M S X P H I L M C E A A J N N O I A A	<i>Leishmania mexicana mexicana</i>	ULCERA DE LOS CHICLEROS BARRA VEZ LCD	ADULTOS	ROEDORES SELVATICOS PERRO	<i>L. Olasco-obasco</i>	MEXICO, HONDURAS, COSTA RICA, GUATEMALA Y BELICE.
	<i>Leishmania mexicana amazonica</i>	L.C.I. L.C.D.	POCO FRECUENTE	ZORROS	<i>L. Flaviscutanea no es antropofila</i>	BRASIL, VENEZUELA, SURINAM Y COLOMBIA.
	<i>Leishmania mexicana pifanoi</i>	L.C.D.	ADULTOS	ROEDORES SELVATICOS	<i>L. Flaviscutanea</i>	VENEZUELA Y BRASIL.
COMPLEJO LEISHMANIA BRAZILIENSIS	<i>Leishmania brasilensis brasilensis</i>	ESPUNDA & LEISHMANIASIS MUCOCUTANEA	ADULTOS		<i>L. intermedia</i> <i>L. guayanae</i>	VENEZUELA, PERU, ECUADOR, BOLIVIA, PARAGUAY Y COLOMBIA.

ANTECEDENTES HISTORICOS

En el viejo mundo, al parecer la primera descripción de la leishmaniasis tegumentaria es atribuida a El-Razi en Irak alrededor del año 1500 de nuestra era. En 1885 Allownyan publicó un trabajo sobre el padecimiento en Aleppo, Siria y en ese mismo año, Cunningham observó por primera vez a los parásitos a los que supuso "esporas incluidas en una amiba".

En 1898, Piotr Fokitch Borowsky al estudiar casos de leishmaniasis cutánea descubrió a su agente causal, pero al ser publicado su trabajo en ruso, pasó desapercibido para los científicos occidentales. En 1903, Leishman describió a los parásitos causantes del kala-azar, en el mismo año pero dos meses después, Donovan los describió en el mismo padecimiento. Ross creó el género *Leishmania*, en honor a Leishman y Wright (1903) describió el botón de oriente, llamándole *Leishmania trópica*.^{47,48.}

LEISHMANIASIS EN MEXICO

Seguramente las leishmaniasis existieron en América precolombina y desde luego en México, así Diego López de Colubdo en su historia de Yucatán, relató que los primeros franciscanos que intentaron convertir a los Itzaes del Petén, encontraron numerosos indígenas con las "orejas podridas". En 1927, Pailla Bolaños publicó el hallazgo de idótilos con "orejas comidías", mutilaciones que no parecían debidas al tiempo, sino hechas exprofeso.

Sin embargo, el primero que describió la leishmaniasis tegumentaria en Yucatán y por ende en México, fue Setdelin en 1912 quien la llamó úlcera de los chicleiros por encontrar las lesiones ulcerosas con mucha frecuencia en las orejas de este tipo de trabajadores; aunque según Ichaustegui fue Paz, el primero en ocuparse de la leishmaniasis tegumentaria en esa región. En 1913, Hernández Fajardo publicó un trabajo sobre esta parasitosis en Yucatán, y ese mismo año Cervera describió un caso en la revista de la Escuela Médico Militar.^{47,48.}

DISTRIBUCION GEOGRAFICA

Las leishmaniasis en México se distribuyen al menos en 17 entidades, desde Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas por el norte Veracruz, Tabasco y Campeche por el Golfo, y por el Pacífico los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa. También afecta estados mediterráneos como San Luis Potosí, Morelos y Puebla⁴⁰, como puede observarse la distribución de las leishmaniasis se ha modificado del año de 1990 (figura 1), al año de 1994 (figura 2).

**Distribución geográfica de las especies
de la Leishmania en México (Fig. 1)**






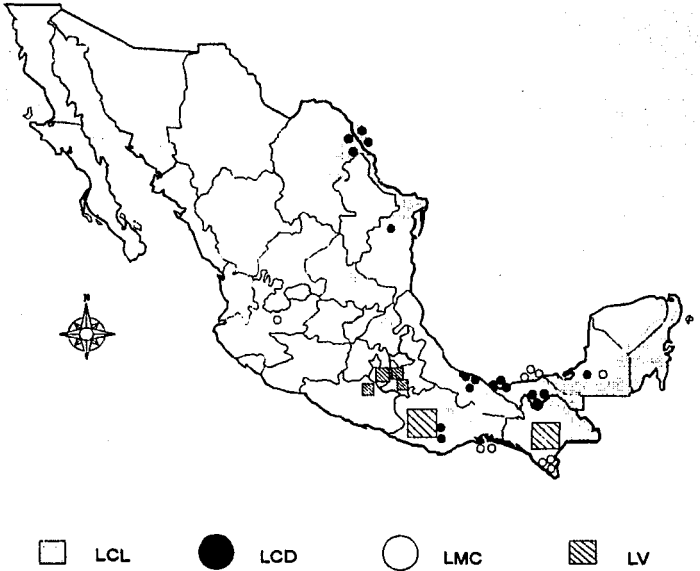
-  **Leishmania mexicana mexicana**
-  **Leishmania braziliensis braziliensis**
-  **Leishmania donovani chagasi**

FIG. 2

Las leishmaniasis en México



OCT - 1994

VECTORES

Los vectores de la *leishmaniasis* pertenecen a la subfamilia *Phlebotominae*, puede transmitir la enfermedad por lo menos 70 de las 600 subespecies conocidas. En el Nuevo Mundo el vector es el género *Lutzomyia* y en el Viejo Mundo, *Phlebotomus*, discutiéndose el papel de *Sergentomyia*.

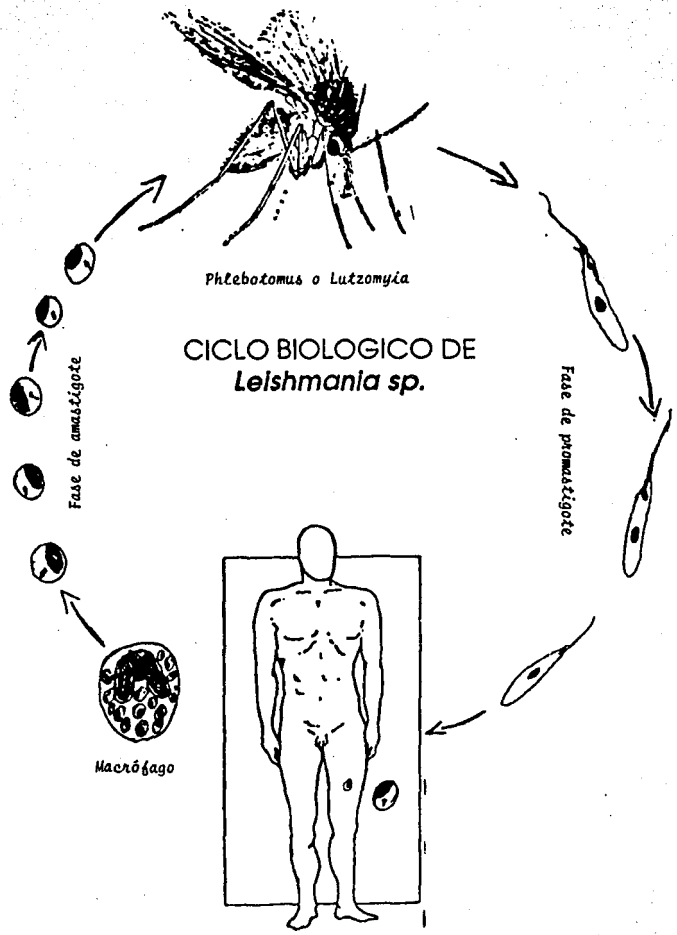
Los flebotomos son dípteros de pequeño tamaño, unos 5 mm, de alas lanceoladas, revestidos en su totalidad de cerdas. Están distribuidos en todo el mundo, culminando en ciclos completos durante todo el año en áreas tropicales y sólo de mayo a octubre en la región paleártica, sobreviviendo a la estación fría (diapusa) en cuarto estadio larvario. Los hábitats varían desde los prototipos de selva húmeda a regiones áridas. El vuelo es corto, silencioso y la picadura dolorosa.

Las hembras adultas, únicas hematófagas, ponen de 50 a 100 huevos en lugares arenosos con humedad alta pero no encharcados, ricos en detritus orgánicos para que se puedan alimentar las larvas, después de 4 estadios larvarios que se realizan en 2 a 4 semanas, adquieren la fase de pupa para emerger los adultos al cabo de 7 días; en ese momento las hembras son fecundadas, alojándose el semen en la espermateca. Ellos necesitan ingerir sangre para desarrollar los óvulos. Viven una media de 6 semanas²⁶. La peligrosidad epidemiológica de una especie viene determinada por factores de densidad de población flebotómica y expectativa de vida en directa relación con factores climáticos puesto que, una vez infectados, son capaces de inocular Leishmanias durante toda la vida.

CICLO BIOLÓGICO

La Leishmania presenta dos fases en su ciclo de vida, una móvil llamada promastigote, éste es fusiforme mide de 6 a 20 micras de longitud su núcleo es central, cinetoplasto anterior y presenta un flagelo exterior se encuentra en los flebotomos y en los cultivos. La otra fase de Leishmania es inmóvil se encuentra en el hombre como un corpúsculo oval o redondeado de 2 a 6 micras de longitud viviendo dentro de las células del sistema fagocítico mononuclear o en casos excepcionales en células endoteliales. El desarrollo en el intestino del insecto es sencillo: Las leishmanias se convierten en leptomonas y se dividen por fisión binaria longitudinalmente formando dos individuos. Se alojan exclusivamente en el tubo digestivo, el desarrollo del parásito se presenta en el estómago o hacia la parte anterior del tubo digestivo (hipofaringe), cuando esto ocurre el cúmulo de parásitos bloquea el tubo digestivo y el insecto regurgita durante la picadura para poder ingerir, transmitiendo en ese momento la infección. En el huésped mamífero el organismo es fagocitado por células fagocíticas, en las cuales se multiplica en forma de amastigote por fisión binaria simple hasta que la célula huésped es destruida y luego son parasitados nuevos macrofagos^{11,17}. (Fig. 3)

Fig. 3



RESERVORIOS

El reservorio, por definición, debe ser un animal que garantice tanto la existencia del protozoo como su posterior transmisión. Para ello tendrá que reunir una serie de condiciones en mayor o menor grado como son: alta enzootia, proximidad entre humano y vector y la evolución crónica de la parasitosis en él.

En general se considera que los roedores silvestres son los reservorios de la leishmaniasis tegumentaria y que los cánidos silvestres y domésticos, los de kala-azar. Sin embargo en ciertas regiones e idémicas de leishmaniasis cutánea de Brasil, Argentina, Perú, Panamá y Costa Rica se han observado perros con lesiones típicas a los que se les ha aislado el agente etiológico.³⁸

En México se supone, sin que nadie lo haya probado, que al igual que en Bélize los roedores silvestres que sirven de reservorio para la infección por *Leishmania mexicana* podría ser: *Otolyomys phyllotis*, *Heteromys desmanestlanus*, *Nyctomys sumichrasti* y *Sigmodon hispidus*. En un estudio efectuado por Velasco y col. en Santiago Jalahul, Oaxaca, en 1981, de un total de 139 perros se encontraron 7 con lesiones ulcerosas típicas en nariz y orejas y aunque el aspecto histopatológico sugería fuertemente el diagnóstico de leishmaniasis sólo se identificó el parásito en un perro^{38,39}. En 1987, Velasco y Lebrija aislaron *Leishmania* sp de un tejón, sin embargo, por su conducta en hámster, y el medio de cultivo y por su resistencia a la terapia con antimoniales, pareció tratarse de *Leishmania braziliensis*⁴⁷.

Cuadro No.2 POSIBLES RESERVORIOS DE LEISHMANIASIS CUTANEAS EN MEXICO

ANIMAL	LOCALIZACION
Roedores	Bélize y península de Yucatán
Perro doméstico	Oaxaca y Quintana Roo
Tejón	Chiapas

FORMAS CLINICAS Y REPUESTA INMUNOLOGICA EN EL HUMANO

Leishmaniasis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicheros. Es causada por Leishmania mexicana mexicana. Esta forma clínica, se caracteriza habitualmente por una úlcera pequeña y única aunque puede ser grande y múltiple, si el transmisor picó en forma repetida al ser ahuyentado durante su hematofagia o cuando el huésped fue simultáneamente picado por varios vectores. La úlcera es generalmente redondeada, de bordes indurados, fondo limpio e INDOLORA y aparece aproximadamente 15-20 días después de la picadura infectante. Al principio es un pequeño nódulo, pruriginoso, que evolucionó hacia la úlcera, aunque algunas veces la lesión continúa siempre nodular y se transforma en una placa infiltrada o atrofica e inclusive se vuelve vegetante. La intradermorreacción es positiva, los macrófagos no pasan al torrente sanguíneo. La respuesta inmunitaria humoral es baja o está prácticamente ausente mientras que la celular es positiva.

Leishmaniasis cutánea diseminada (LCD) o leishmaniasis leproide. Se inicia habitualmente por un nódulo que no sea úlcera y se disemina por vía linfática, dando múltiples nódulos que simulan una esporotricosis. Esta diseminación es habitualmente muy lenta. De estos sitios los parásitos se diseminan por el líquido tisular, por la linfa o por la sangre llegando a colonizar prácticamente todo el tegumento con la excepción del cuero cabelludo, la región axilar, inguinal, genitales externos y palmas de las manos y plantas de los pies, aunque en algunos enfermos mexicanos se han encontrado lesionados los genitales externos. Las plantas de los pies y con frecuencia las mucosas orofaríngeas y nasales, cuadro no.3. De esta última se ha aislado Leishmania mexicana incluso cuando el área no está afectada. Es de presentación esporádica extendida desde el sur de Texas y Coahuila hasta Chiapas, no encontrada hasta ahora en Yucatán y en Quintana Roo.

En este tipo de pacientes la IDR es negativa, aunque puede volverse positiva en algunas ocasiones y presenta elevados títulos de anticuerpos.

Cuadro No.3 CARACTERÍSTICAS DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA DISEMINADA EN MEXICO

- Lesiones en placas o nódulos diseminados en todo el tegumento, excepto a cuero cabelludo, regiones axilares e inguinales, genitales y plantas de los pies.
- No involucra mucosas ni víceras. (En México, con frecuencia involucran mucosas nasales y orofaríngeas)
- Parásitos muy abundantes dentro de macrófagos vacuolados, incluso en piel aparentemente sana.
- Alergia a leishmanina y frecuentemente a otros antígenos ubicuos: PPD y caudilina.
- Refractaria a medicamentos específicos.

Leishmaniasis mucocutánea (LCM) o espundia

Presenta lesiones muy destructivas de mucosas nasales y orofaríngeas, que pueden entorpecer la fonación y la deglución e incluso producir inanición, debido al intenso dolor. No cura espontáneamente y resisten la quimioterapia específica. En México, sólo se han observado casos en Veracruz, Tabasco, Chiapas y Oaxaca²⁰. En su expresión, se encuentran entre las cutáneas y las víceras, siendo la detección de anticuerpos y la respuesta a la intradermorreacción más o menos litensas. Es causada por Leishmania (Vianna) braziliensis y Leishmania mexicana mexicana.

Leishmaniasis visceral (LV) o Kala-azar. Es causada por Leishmania donovani y subespecies en el viejo mundo y por Leishmania chagasi en el nuevo mundo. El Kala-azar puede presentarse en tres modalidades endémica, esporádica y epidémica.

a) La leishmaniasis visceral endémica es común en América Latina, afecta primordialmente a niños entre 1 y 4 años y predomina en el sexo masculino (2:1). El período de incubación oscila de 10 días o más de un año y el cuadro clínico se inicia gradualmente. Los signos y síntomas más frecuentes son fiebre, a veces con picos cotidianos dobles, malestar general caquexia, así como hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia y palidez de mucosas. El oscurecimiento de la piel, particularmente de la cara, abdomen, pies y manos es común en la India (Kala-azar significa enfermedad negra) En tanto que en América es ligero y esporádico. En México existe esta modalidad pero ataca tanto a niños como adultos.

b) La forma esporádica de leishmaniasis visceral se observa en individuos no nativos en un área endémica. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre de inicio brusco que comienza tres semanas o dos años después de la exposición a la picadura de *Lutzomyia* infectante. La enfermedad puede evolucionar en forma aguda con escalofríos, fiebre, pérdida de peso, caquexia, y malestar general intenso. Estos pacientes con cierta frecuencia desarrollan complicaciones poco comunes: anemia hemolítica grave, insuficiencia renal aguda y hemorragia grave de las mucosas.

c) La forma epidémica de la leishmaniasis visceral se observa a veces en las áreas endémicas y puede involucrar a todos los grupos etarios, particularmente del sexo masculino (3 a 4). Habitualmente cursa en forma crónica^{3*}.

DIAGNOSTICO

El diagnóstico de las leishmaniasis puede darse basándose en el diagnóstico clínico y el diagnóstico de laboratorio.

DIAGNOSTICO CLINICO:

a) *Leishmaniasis cutánea localizada*: resulta relativamente fácil para un individuo entrenado, ya que consiste en la observación de una lesión ulcerosa y pequeña, indolora, redondeada de bordes indurados y fondo limpio, en la piel del cuerpo. En las orejas las lesiones aunque nodulares en un principio casi siempre se ulceran, dando lesiones destructivas, muy crónicas; a veces se convierten en vegetantes. Además de este tipo de lesiones que son las más comunes se observan otras de tipo infiltrativo (placa infiltrada), nodular, placa atrófica e incluso lesiones vegetantes, que suelen confundirse con tumorraciones.

b) *Leishmaniasis cutánea diseminada*: se inicia habitualmente en una lesión nodular, que evoluciona lentamente para después diseminarse aparentemente por vía linfática para formar nuevos nódulos. En esta etapa los parásitos se distribuyen rápidamente, dando nuevas lesiones grandes ó lesiones pequeñas simulando lesiones herpétiformes.

c) *Leishmaniasis mucocutánea o espundia*: son típicas las lesiones de mucosas nasales y orofaríngeas suelen aparecer simultáneamente meses o años después de una lesión primaria, ya cicatrizada, incluso más de 30 años después de una lesión primaria, ya olvidada, las lesiones mucocutáneas metastásicas son grandemente destructivas y afectan mucosas y cartilago de las regiones oronasal y faríngea.

d) *Leishmaniasis visceral*: los signos clínicos habituales son esplenomegalia, con o sin hepatomegalia, consunción y palidez de las membranas mucosas, puede haber linfadenopatía, y las manifestaciones clínicas varían dependiendo de la zona endémica.^{16,11.}

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

En las leishmaniasis como en todas las enfermedades causadas por un parásito la observación o aislamiento del agente etiológico son determinantes. Sin embargo en esta parasitosis, como ocurre en muchas otras, la visualización o aislamiento del parásito no resulta sencillo por lo cual es necesario utilizar una serie de métodos para dar un diagnóstico válido, entre los cuales esta:

a) *Diagnóstico parasitológico*. Se realiza mediante aspirado de la úlcera o de la médula ósea en las formas viscerales. Se hace un frotis con el material obtenido que se tiñe con colorante de Giemsa, alcanzándose una positividad del 60%^{17.}

b) Cultivo. El aspirado medular sobrenadante o parte de muestra cutánea (micobiopsia) debe ser inoculado en dos tubos evitando la contaminación. El primero debe ser realizado por personal adiestrado para ello, el segundo consiste en lo siguiente: con una jeringa que contenga 2-3 ml de la parte líquida de un medio bifásico (solución de Ringer en caso de un medio NNN) o misma cantidad de un medio líquido (Schneider), se tomará una pequeña porción del tejido del borde de una lesión leishmaníptica (previamente desinfectada mediante lavado con agua y jabón o simplemente con una torunda de alcohol al 70%). Introduciendo la aguja, al mismo tiempo se realiza un movimiento de rotación y se aspira, jalando el émbolo. Una vez extraída la aguja hipodérmica de la lesión se inocula al medio a través de un tapón de hule, evitando con esto su contaminación por hongos¹⁴. Las Leishmanias tardan varios días en alcanzar la forma libre flagelar y a veces se requieren de 2 o 3 pases en ciego cada 7/10 días para evitar la oxidación excesiva de la sangre, antes de que se vean las leishmanias. Aunque su sensibilidad es bastante menor, el cultivo debe practicarse ya que puede ser positivo siendo negativo los otros métodos (en especial, en enfermos inmunodeprimidos sin respuesta humoral y fiebre persistente de origen desconocido); cuando se desean aplicar pruebas de sensibilidad a distintos medicamentos; y para caracterizar la cepa con fines epidemiológicos o de pronóstico, sobre todo si la enfermedad se encuentra en zonas no endémicas.

c) Diagnóstico inmunológico: Es de suma importancia sobre todo si el diagnóstico parasitológico ha sido negativo.

Con el propósito de indagar la respuesta dependiente de linfocitos T, se cuenta con una prueba cutánea de hipersensibilidad tardía con el uso de leishmanina, hecha de *Leishmania sp.* muertas con formol o por un extracto total de *Leishmanias* crecidas en condiciones *in-vitro*. A esta prueba se le conoce como reacción de Montenegro¹⁶, es altamente específica por lo que no se encuentran resultados positivos falsos, solamente se manifiesta en sujetos que estén o hayan estado en contacto con el agente infeccioso, pero reacciona en forma cruzada con micobacterias por similitud antigénica¹³. Así, mientras la reacción de Montenegro se presenta en prácticamente en el total de individuos con lesiones cutáneas activas compatibles con leishmaniasis cuya evolución sea mayor de uno a dos meses, en los mismos sujetos el hallazgo morfológico o la detección del parásito no rebasa del 40 o 50%.¹⁶

Una de las técnicas más utilizadas en el diagnóstico serológico es la inmunofluorescencia indirecta que puede detectar presencia de anticuerpos desde la segunda semana^{7,15}, utiliza como antígeno tanto promastigotes como amastigotes. Es una técnica muy sensible pero puede presentar reacciones cruzadas a títulos bajos, con lepra, malaria, y tripanosoma⁷.

TRATAMIENTO

Los objetivos del tratamiento son curar al paciente, que con frecuencia padece malnutrición e inmunosupresión, de esta infección parasitaria, prevenir recaídas, y reducir al mínimo la hospitalización en el caso de *leishmaniasis visceral* y de *leishmaniasis cutánea diseminada*. Para alcanzar esos objetivos, se debe administrar el medicamento apropiado en las dosis y con la frecuencia adecuada durante un período conveniente⁷.

Aunque se suele considerar que los componentes de antimonio pentavalente son los medicamentos a que se ha de recurrir en primera instancia, existe diversidad en su empleo ya que debe considerarse el tipo de leishmaniasis. Se dispone de dos antimoniales, el antimonio de meglumina y el estibogluconato de sodio, que son químicamente similares y cuya toxicidad y eficacia parece estar en relación con su contenido de antimonio pentavalente (Sb^{5+}): La solución de antimonio de meglumina contiene aproximadamente un 8.5% de Sb^{5+} (85 mg/ml), mientras que la solución de estibogluconato de sodio contiene alrededor de un 10% de Sb^{5+} (100 mg/ml).

El tratamiento adecuado de acuerdo a la manifestación clínica de la leishmaniasis se describe a continuación.

1) *Leishmaniasis visceral*: El tratamiento inicial de los casos de L.V. demostrada, debe consistir en una inyección diaria de 20 mg de Sb por kg de peso corporal, hasta un máximo de 850 mg. Esto equivale a una dosis diaria máxima de 10 ml de antimonato de meglumina o 8.5 ml de estibogluconato de sodio. Las inyecciones suelen administrarse durante un mínimo de 20 días. Pero esto es variable dependiendo de la zona de endemidad, pero ha de continuar en todo caso dos semanas después de la curación parasitológica aparente, debiendo determinarse individualmente la duración exacta para cada paciente. Por ejemplo, en la India, se ha visto que da los mejores resultados un tratamiento de 40 días, mientras que en China, se ha notificado que los tratamientos de seis días producen una tasa de curación superior al 90%.

El tratamiento con antimoniales suele ser bien tolerado, pero si se presentan efectos secundarios graves (en la mayor parte de los casos, relacionados con la hepato o la cardiotoxicidad), puede ser prudente interrumpirlo temporalmente. Si hay recaídas, debe administrarse de nuevo un antimonial en primer lugar. Si la respuesta es insatisfactoria o hay falta de respuesta primaria, los fármacos de primera línea son la anfotericina B y la pentamidina.

La anfotericina B se administra diariamente o tres veces por semana por vía intravenosa en dextrosa al 5% durante 4 horas comenzando con una dosis inicial de 5-10 mg, que aumente paulatinamente 5-10 mg en cada administración hasta alcanzar una dosis de 0.5-1 mg por kg de peso corporal. El tratamiento debe continuar hasta haber administrado una dosis total de 1-3 mg y su duración depende de la respuesta. Hay recaída o falta de respuesta en 2-8% de los casos²¹.

La pentamidina debe administrarse en dosis de 4 mg/kg de peso corporal, tres veces por semana, durante un período de 5 a 25 semanas, incluso más si es necesario.

La leishmaniasis post-kala-azar se trata como la leishmaniasis visceral salvo que el tratamiento debe ser por lo menos de cuatro meses.

2) Leishmaniasis cutánea: Aunque la leishmaniasis cutánea es la manifestación más común de la infección leishmánica, no existe un tratamiento bien establecido. A menudo se considera que los antimoniales sistémicos son demasiado costosos y demasiado tóxicos para utilizarlos contra una lesión relativamente benigna y que remite espontáneamente. Se han utilizado inyecciones locales de un antimonial, una solución al 10% de sulfato de barbitina o una solución al 5% de mepracina o de emetina. Se usan también ungüentos locales, que no se han evaluado suficientemente. Se recomiendan así mismo tratamientos físicos como raspados, rayos X blandos, aplicación local de calor y congelación local³⁷.

3) Leishmaniasis mucocutánea ó espundia: La leishmaniasis causada por *Leishmania braziliensis* tiende a convertirse en espundia si el tratamiento es incompleto y, en las zonas en que se sospecha su presencia, todas las lesiones cutáneas primarias deben tratarse con una dosis diaria de 20 mg de Sb por kg de peso corporal durante un mínimo de cuatro semanas³⁷.

TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

DEFINICION: La inmunofluorescencia es esencialmente una técnica histoquímica o citoquímica para la identificación y localización de antígenos en cortes de tejido o para la detección de anticuerpos contra antígenos previamente pegados a placas de vidrio. El anticuerpo específico es conjugado con compuestos fluorescentes, resultando un trazador sensible con reactividad inmunitaria inalterada^{60,61,63}.

La técnica de inmunofluorescencia fue introducida en 1941 por Coons, el cual empleaba B-antraceno, un compuesto fluorescente de color azul, conjugado con antisero antineumocócico para describir los antígenos bacterianos en los cortes de tejidos.

Poco después su grupo empleó antiseros conjugados con fluoresceína, la cual emite una luz verde que puede ser diferenciada de la fluorescencia de color azul de muchos tejidos.

Esta técnica consiste en añadir un antisero conjugado a un fluoróforo a las células y se fija a los antígenos formando, por lo tanto, un complejo inmunológico estable. Los fluorocromos como la rodamina o la fluoresceína son los más empleados estos tienen espectros característicos de absorción y emisión. El isotiocianato de fluoresceína (ITCF) es una forma de fluoresceína que con facilidad se fija a las proteínas mediante enlaces covalentes a un pH alcalino, primordialmente de grupos amino terminales. Su absorción máxima es de 490-495 nm y emite su color verde característico a 525nm.

El isotiocianato de tetrarodamina que emite luz roja, tiene una absorción máxima a 550 nm y una emisión máxima a 580nm y tiene un color rojo característico.




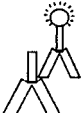
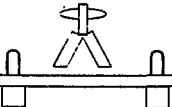

a) Inmunofluorescencia directa (IFD): La solución de anticuerpos específicos fluoresceinados se aplica sobre las células, se incuban y se lava. Los anticuerpos unidos se revelan después con un microscopio provisto de lámpara de luz ultravioleta, se dirige la preparación a través del objetivo, con lo que al campo aparece oscuro y las áreas con anticuerpos presenta fluorescencia verde.

b) Inmunofluorescencia indirecta (IFI): El anticuerpo específico se aplica sobre la célula y luego, después de lavarlo se añade antisero anti-Ig fluoresceinado. (fig. 4)

c) Indirecta amplificada por complemento: Este método es una modificación de la técnica indirecta para detectar anticuerpos fijadores del complemento. En el segundo paso, después de haber aplicado el anticuerpo se añade un complemento fresco, que se fija alrededor del lugar donde se han unido los anticuerpos. Debido a los pasos de amplificación en la vía clásica del complemento, una molécula de anticuerpo puede causar la fijación de moléculas de anticuerpo puede causar fijación de muchas de C3b al corte; estas moléculas se visualizan después con un antisero anti-C3 fluoresceinado. (fig. 4).

TECNICA DE INMUNOFLOURESCENCIA

Fig 4.

DIRECTA	INDIRECTA	INDIRECTA AMPLIFICADA CON COMPLEMENTO
<p>ANTICUERPO FLOURECENADO</p>  <p>CORTE DE TEJIDO</p>	<p>ANTICUERPO ESPECIFICO</p>  <p>CORTE DE TEJIDO</p>	<p>ANTICUERPO ESPECIFICO</p>  <p>CORTE DE TEJIDO</p>
<p>LAVAR</p>	<p>LAVAR</p>	<p>LAVAR</p>
<p>LAVAR</p>	<p>AÑADIR ANTICUERPO ANTI-IG FLUORESCENADO</p> 	<p>AÑADIR COMPLEMENTO</p> 
<p>LAVAR</p>	<p>LAVAR</p>	<p>LAVAR</p>
<p>LAVAR</p>	<p>AÑADIR ANTICUERPO ANTI-C3 FLUORESCENADO</p> 	<p>LAVAR</p>

TECNICA DE ELISA

El Inmunoensayo enzimático fue descrito por primera vez en el año de 1971 por Engvall y Perlman, quienes utilizaron enzimas como marcadores inmunológicos en sustitución de los radioisótopos, para uso en los análisis de enlace competitivo. Los métodos más conocidos comprendidos dentro de las técnicas de Inmunoensayo son: ELISA (análisis de Inmunoabsorción enzimática), EMIT (Inmunoanálisis con multiplicación enzimática) y EIA (Inmunoanálisis enzimático)²².

Los Inmunoensayos enzimáticos generalmente son de dos tipos: a) ensayos homogéneos, en donde el marcador libre y fijado debe separarse físicamente antes de su identificación (EMIT) y b) ensayos heterogéneos, donde es posible distinguir el marcador libre ante un marcador fijado (ELISA).

La técnica de ELISA utiliza como reactivos anticuerpos anti-inmunoglobulina unidos a una enzima. Estos anticuerpos reaccionan con las inmunoglobulinas combinadas con su antígeno. La reacción se visualiza agregando el sustrato específico de la enzima que se utilizó. Esta técnica puede utilizarse tanto en la búsqueda de antígenos como de anticuerpos.

La identificación de antígenos utilizando ELISA puede realizarse mediante dos métodos:

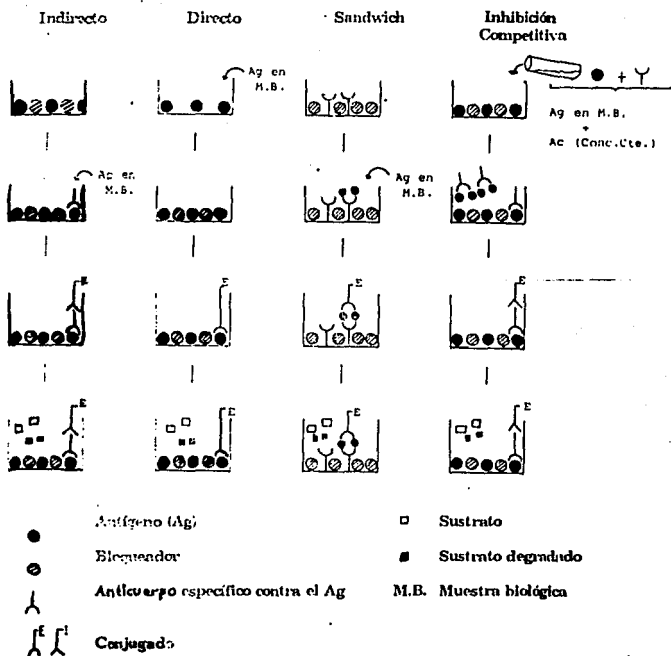
1.- Método directo o técnica del emparejamiento utiliza un anticuerpo específico fijado a un soporte o fase sólida (placa de microtitulación). Se hace un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo (bloqueo en placa), y se coloca el antígeno suero problema. Este se adherirá al anticuerpo específico fijado al soporte. Se efectuará otro lavado y se añade una solución de anticuerpo específico enlazado covalentemente a una enzima. Un tercer lavado se realiza con el objeto de eliminar el exceso de complejo enzima anticuerpo no fijos. Se añade a los pozos de la placa el sustrato correspondiente para la enzima conjugada. La cantidad de antígeno determinará la cantidad de enzima anticuerpo, lo que a su vez, repercutirá en la intensidad de la reacción manifestada por un cambio de color (fig.5). La desventaja de esta técnica es que se requiere de un conjugado separado de una enzima y de un anticuerpo específico para la identificación de cada antígeno^{40,41}.

2.- Método indirecto, es ampliamente utilizado para determinación de anticuerpo, ya que se necesitan sólo unos pocos conjugados (ej., antioglobulinas humanas marcadas con enzimas) para analizar anticuerpos de una variedad de enfermedades. El antígeno fijado a una fase sólida será de una especie animal. Después de agregar el antígeno, se añade un anticuerpo específico no marcado de otra especie animal que reaccionará con el antígeno de la fase sólida. Se eliminará el exceso de anticuerpo no fijo mediante un lavado. Se añadirá un tercer anticuerpo unido a la enzima dirigido contra la globulina de la segunda especie animal. Como resultado habrá un cambio de color, que estará determinado por la cantidad de antígeno encontrado en la muestra.

Para la identificación de anticuerpos, se utiliza el antígeno que se encuentra fijado (directamente o por medio de un anticuerpo). Se agrega el suero problema. Si posee anticuerpos, éstos se unirán al antígeno causando una reacción. Esto es evidente con el reactivo enzimático y sustrato.

La técnica de ELISA identifica pequeñas cantidades de reactivos inmunológicos y la reacción de antígeno-anticuerpo no modifica la actividad del marcador enzimático en comparación con otras técnicas^{10,12}

Figura 5



FUNDAMENTACION DE LA ELECCION DEL TEMA

El diagnóstico de las Leishmaniasis fue realizado inicialmente sobre criterios clínicos que consisten en la observación de una lesión ulcerosa, indolora, redondeada de fondo limpio; además de la distribución geográfica de la parasitosis.

Posteriormente se utilizó una prueba cutánea de hipersensibilidad tardía con el uso de *Leishmania sp.* muerta en formol (Leishmanina). Esta prueba se conoce como reacción de Montenegro, es altamente específica y solamente se manifiesta en sujetos que estén o hayan tenido contacto con el agente infeccioso.

En los últimos años se han buscado procedimientos de laboratorio para la identificación rápida de anticuerpos contra *Leishmania* que presenten ventajas en la relación con las técnicas de diagnóstico clásicas como es la observación parasitológica (IMPRONTA) y simple clínica.

Una de estas técnicas es la técnica de IFI que ofrece especificidad y menor tiempo de procesamiento de las muestras. Esta consiste en revelar sitios antigénicos, presentes sobre una estructura tisular, celular o en antígeno pegado a placas de vidrio mediante la aplicación sobre éstos de un antisero específico que previamente se vuelve fluorescente por la fijación de fluorocromo.

Los fluorocromos más empleados son los isotiocianato de fluoresceína que da una fluorescencia verde y el isotiocianato de rodamina que da una coloración roja.

Entre las desventajas que ofrece esta técnica es su alto costo, además de equipo especial (microscopio con la lámpara de fluorescencia) y personal especializado.

Por lo tanto se hace necesario la aplicación y estandarización de una técnica que, además de ser específica, permita el diagnóstico oportuno de esta parasitosis e impedir la diseminación que puede ser fatal, de esta manera, canalizar al paciente a un tratamiento adecuado. Esto sin el empleo de equipo específico y personal capacitado. Creemos que la técnica ELISA una vez estandarizada, resultará ideal para el diagnóstico oportuno de esta parasitosis.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el laboratorio de Leishmaniasis del INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico), el diagnóstico se realiza por la clínica de la enfermedad, observación parasitológica (IMPRONTA), IDR, realización de cultivos para aislar al parásito y por detección de anticuerpos con la técnica de IFI (inmunofluorescencia indirecta).

Se ha observado que en la mayoría de los de los casos no todas las pruebas son positivas, aunque el parásito este presente, solo una o dos lo son, y el diagnóstico se da apoyado por la observación clínica, así como aspectos epidemiológicos involucrados con el paciente. Por lo cual es gran importancia estandarizar un método de diagnóstico que sea sensible y a la vez barato como el de ELISA, en el cual se puede manejar fácilmente en campo y trabajar muchas muestras a la vez, y no requiere de personal altamente especializado.

Además, se hace necesario detectar y minimizar las cruces antigénicas que se presentan con otros tripanosomatidos relacionados, para poder encaminar a el paciente a un tratamiento adecuado.

Una vez estandarizada esta técnica, puede comprobarse si es más sensible y específica que otros métodos diagnósticos, y si esto es mejorado cuando el antígeno utilizado proviene de la zona endémica donde se presenta esta parasitosis.

OBJETIVOS GENERALES

- Obtener y purificar el antígeno de *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania chagasi*.
- Estandarizar la técnica de ELISA (inmunoensayo enzimático) para el diagnóstico de Leishmaniasis.

OBJETIVO PARTICULAR

- Realizar un estudio comparativo entre la técnica de IFI y ELISA para el diagnóstico de Leishmaniasis.

HIPOTESIS

Una vez aislado el antígeno de *Leishmania* de la zona endémica donde se presenta esta parasitosis y al estabilizarlo en formalina se estandarizará la técnica de ELISA, la cual tendrá una mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de leishmaniasis. Con lo que el diagnóstico de esta enfermedad mejorará haciéndose más confiable y oportuno.

MATERIAL Y EQUIPO

Material biológico.

- 120 sueros de pacientes con Leishmaniasis de diferentes zonas endémicas de la República Mexicana, proporcionados por el INDRE
- 14 sueros de personas sanas.
- Antígeno de *Leishmania chagasi*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania mexicana*.

Material de vidrio.

Matras volumétricos	50, 100, 1000 y 2000 ml
Pipetas graduadas	2, 5 y 10 ml
Pipetas Pastuer	
Placas para IFI	50, 100, 250, y 500 ml
Probetas	50, 100 y 500 ml
Vasos de Coplin	
Vasos de precipitados	50, 100, y 500 ml
Tubos de ensaye	13x100 y 12x 75 mm

Material diverso

Barras magnéticas	
Espátula	
Gradillas	
Placas de poliestireno	96 pozos
Papel para film	
Pipetas tipo Eppendorf	p-100, p-250
Puntas para pipetas	

EQUIPO

Balanza analítica	Mettler
Centrífuga	Sol Bai
Espectrofotómetro	Spectronic 20
Lector de ELISA	Dymatech
Microscopio de luz visible	Carl Zeiss
Lámpara de UV	Carl Zeiss
Sonificador	Bronix
Tanque de N ₂	
Ultracentrífuga	Damon

REACTIVOS

Sólidos.

Ácido cítrico	Merck
Bicarbonato de sodio	Merck
Albumina sérica bovina	Sigma
Carbonato de sodio	Sigma
Cloruro de potasio	Merck
Cloruro de sodio	Sigma
Fosfato disódico dodecahidratado	J.T Baker
Fosfato monosódico	J.T Baker
Hidróxido de sodio	J.T Baker
Leche descremada	Sveltest
Sulfato de cobre	J.T Baker
Tartrato de sodio y potasio	Merck
Timerozal	Sigma
Tween 20	Sigma

Líquidos

Acido sulfúrico

Folin-Ciuc

Formaldehído

Glicerol

Peroxido de hidrogeno 32%

Tween 20

J.T Baker

J.T Baker

J.T Baker

J.T Baker

Dosmil

Sigma

Otros

Azul de Evans

Anti-IgG humana en chivo Caldo BHI

Medio de cultivo tiple NNN

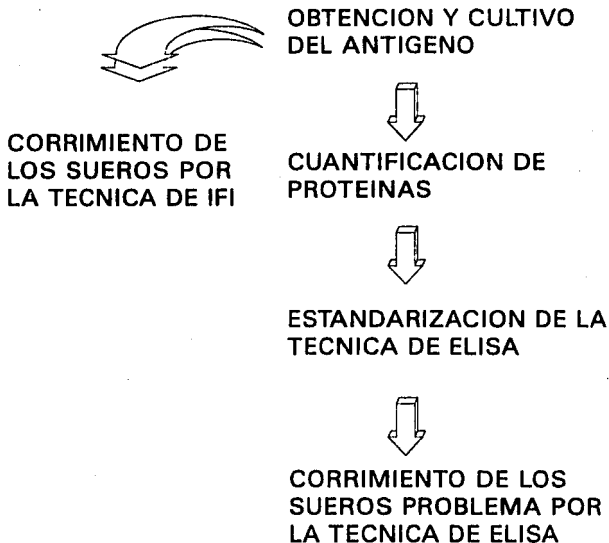
Medio de cultivo RPMI-1640

Sigma

Sigma

Bloxon

METODOLOGIA



METODOLOGIA

Obtención de las cepas de Leishmania

Con una frotis que contenía 2-3ml de caldo BHI, se tomó una pequeña porción de tejido del borde de una lesión leishmaniasis (previamente desinfectada mediante lavado con agua y jabón). Una vez extraída la aguja hipodérmica de la lesión se inoculó en un tubo de medio NNN, donde crecieron las leishmanias; posteriormente se realizó un pase al medio RPMI (sigma), suplementado con hemoglobina al 10% y se mantuvieron a temperatura de 22 °C, hasta su crecimiento a fase estacionaria, aproximadamente 7 días.

Obtención del Antígeno Soluble (ELISA) El cultivo se centrifugó a 6,000 rpm durante 20 minutos, se tiro el sobrenadante. El botón obtenido se lavó dos veces con PBS a 6,000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se llevó a 10 ml con PBS. Se realizó 10 veces la congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño maría a 37°C del antígeno. Lo obtenido se centrifugó a 10,000 rpm durante una hora, el sobrenadante se colectó en una botella estéril. El antígeno se estabilizó con formalina al 0.1% y timerozal al 0.01%.

Obtención del Antígeno Particulado (IFI) El cultivo se centrifugó a 6,000rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante. El botón obtenido se lavó dos veces con PBS a 6,000 rpm durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y se llevó a 10 ml con PBS.

Cuantificación de Proteínas

La cuantificación se realizó por el método de Lowry.²⁸

Las concentraciones encontradas para cada especie fueron las siguientes:

<u>Leishmania braziliensis</u>	1690 µg/ml
<u>Leishmania mexicana</u>	416 µg/ml
<u>Leishmania chagasi</u>	533 µg/ml

Estandarización de la técnica de ELISA

Titulación del Conjugado por ELISA

- Se diluyó una solución STD de IgG humana a 32 µg/l usando como solución dilutora el amortiguador de recubrimiento.
- Se marcaron 7 tubos de la A a la G. En el tubo A se colocaron 3 ml de la solución de IgG y en los tubos de la B a la G se realizaron diluciones al doble con volúmenes de 1.5 ml de amortiguador de recubrimiento. Se agitó perfectamente cada tubo.
- Se colocaron 100 µl en cada pozo de la fila H de amortiguador de recubrimiento, esto se realizó con las demás filas de acuerdo a la dilución (de la más diluida a la más concentrada).
- Se dejó en cámara húmeda 18 horas a 4°C.
- Se tiró el sobrenadante. Se bloqueó con PBS-albúmina sérica bovina al 1% -leche al 5% durante 30 minutos a 37°C, colocando 300 µl en cada pozo.
- Se tiró el sobrenadante y se lavó 4 veces con PBS-Tween dejando actuar un minuto la solución de lavado antes de tirar los sobrenadantes.
- Se etiquetaron 11 tubos (1 al 11) y se realizaron diluciones al doble del conjugado de peroxidasa anti IgG humana usando como solución dilutora PBS-leche al 5% y volúmenes de 1 ml (partiendo de una dilución 1:1000).
- En la hileras 12 se colocaron 100 µl de PBS-leche 5% (testigo de conjugado) con el tubo 11 se llenó la hileras 11 con 100 µl cada pozo lo mismo se hizo con las demás hileras. Se dejó una hora a 37°C.

Titración del Suero por ELISA

- Se adicionaron 100µl de antígeno (8 µg/ml de cada cepa de *Leishmania*) a cada uno de los pozos de la microplaca. La técnica a seguir fue la misma sólo que en este caso se utilizaron 15 sueros de pacientes con diferentes manifestaciones clínicas de Leishmaniasis y 4 sueros de personas sanas. Se utilizaron 6 diluciones de suero y se partió de una dilución 1:100.

Se encontró que los sueros negativos arrojaban absorbancias similares a las de los sueros positivos, por lo tanto, se decidió diluirlos más. Se preparó una placa en donde se corrieron estos sueros, los resultados obtenidos seguían dando valores elevados, por lo que se trató de saber que ocasionaba esto. Buscando las causas se encontró que existían referencias acerca de cruza antigénicas entre *Leishmania spp.* y los diferentes grupos sanguíneos, por lo tanto se montó otra placa en donde se utilizaron dos sueros de grupo sanguíneo O, uno de A, uno de B y un suero positivo. Las lecturas obtenidas mostraron que el suero que presentaba mayor cruza era el de grupo sanguíneo B. Para evitar estas interferencias se decidió absorber los sueros con glóbulos rojos humanos al 5%.

Absorción de Sueros Negativos

- Absorción
- Se lavaron los eritrocitos con solución salina isotónica.
 - Se realizó una solución al 5% con ellos.
 - Se inactivaron los sueros a 56 °C durante 30 minutos.
 - Se colocó un ml de suero en un tubo de ensayo con 0.20 ml de eritrocitos al 5%.
 - Se incubaron a 37 °C durante 30 minutos.

Una vez que se tuvieron los sueros absorbidos se montó la placa correspondiente encontrando que *Leishmania mexicana* era la que arrojaba resultados con mayor cruza antigénica, para evitar esto se propuso absorber el antígeno con glóbulos rojos de carnero (GRC) al 5% por el método de Kabat²⁸.

- La placa se lavó 4 veces como se indica arriba.
 - Se adicionaron 100 μ l del sustrato de peroxidasa y orto-fenilendiamina y se incubó a 37°C durante 15 minutos.
 - La reacción se paró adicionando a cada pozo 50 μ l de ácido sulfúrico 2.5 N.
 - Se leyó la densidad óptica a 492 nm en el lector de ELISA.
- La dilución óptima de conjugado resultó ser 1:1,000.

Titrulación de Antígeno por ELISA

- El antígeno (*Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania chagasi*) se diluyó a 32 μ g/ml usando como solución dilutora amortiguador de recubrimiento.
 - Se marcaron 7 tubos de la A a la G, y se realizaron diluciones al doble de la solución de antígeno.
 - Se colocaron 100 μ l de cada dilución en cada pozo, siguiendo el orden de las filas.
 - Se dejó en cámara húmeda 18 horas a 4 °C.
 - Se tiró el sobrenadante y se bloqueó con PBS-albúmina sérica bovina al 1% - leche al 5% durante 30 minutos a 37°C, colocando 300 μ l en cada pozo.
 - El sobrenadante se tiró y se realizaron 4 lavados a la placa con PBS-Tween dejando actuar la solución de lavado durante un minuto.
 - Se realizaron 4 diluciones de un suero positivo partiendo de una dilución 1:50.
 - Se colocaron 100 μ l de cada una de las diluciones en cada uno de los pozos de las hileras.
 - Se incubó a 37°C durante una hora.
 - Se lavó 4 veces la placa, como se indicó anteriormente.
 - Se colocaron 100 μ l de sustrato de peroxidasa y orto-fenilendiamina a cada pozo.
 - La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos.
 - Se agregaron 50 μ l de ácido sulfúrico 2.5N en cada pozo para detener la reacción.
 - La placa se leyó a 490nm en lector de ELISA.
- Se encontró que la concentración de antígeno adecuada fue de 8 μ g/ml.

Absorción del antígeno con GRC

- Se lavaron dos veces los GRC con solución salina isotónica a 3500 rpm durante 5 minutos.
- Se preparó una solución al 5% con ellos.
- Se colocó un ml de GRC al 5% en un tubo de ensayo que contenía 3 ml de antígeno (i. mexicana).
- Se incubaron a 37°C durante 30 minutos
- Se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos.

El antígeno absorbido se pegó a la placa de microtitulación y se siguió la técnica de ELISA. Los resultados que se obtuvieron en esta placa no variaron con respecto a los que ya se habían obtenido en la absorción de los sueros, por lo tanto se decidió que los sueros tanto positivos como negativos se utilizarían en dos diluciones 1:400 y 1:800.

Corrimiento de los Sueros por ELISA.

- Se adicionó a cada pozo de la placa de microtitulación 100 µl de antígeno.(8 µl/ml)
- Se dejó en cámara húmeda a 4 °C durante 18 horas.
- Se tiró el sobrenadante y se bloqueó con PBS-albúmina sérica bovina al 1%-leche al 5%, colocando 300 µl en cada pozo.
- Se incubó la placa a 37 °C durante una hora.
- Se tiró el sobrenadante y se lavó 4 veces la placa con PBS-Tween, dejando actuar la solución de lavado durante un minuto.
- Se colocó en cada uno de los pozos 100 µl de la dilución de suero (1:400, 1:800).
- Se incubó la placa a 37 °C durante una hora.
- Se lavó 4 veces la placa, como se indicó arriba.
- Se adicionaron 100 µl de conjugado de peroxidasa anti IgG humana (dilución 1:1000), en cada uno de los pozos de la placa.
- Se incubó la placa a 37 °C durante una hora.
- Se lavó 4 veces la placa, como se indicó arriba.
- Se colocaron en cada pozo 100 µl de sustrato de peroxidasa.
- La placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos.
- Se adicionaron 50 µl de ácido sulfúrico 2.5N en cada pozo para detener la reacción.
- La placa se leyó a 490nm en lector de ELISA.

En los cuadros 4, 5, 6 y 7 se muestran los resultados de la titulación del suero por la técnica de ELISA.

Cuadro No. 4 TITULACION DE SUEROS CONTROL NEGATIVO

ANTIGENO: *Leishmania mexicana*
 CONCENTRACION: 8 µg/ml

CONJUGADO: anti IgG humana
 DILUCION: 1:1000

1:100	1:200	1:400	1:500	1:800	1:1000
0.321	0.290	0.328	0.313	0.289	0.274
0.329	0.316	0.304	0.286	0.220	0.191
0.309	0.257	0.248	0.247	0.222	0.184
0.318	0.234	0.230	0.175	0.178	0.264
0.325	0.328	0.326	0.318	0.313	0.299

Cuadro No. 5 TITULACION DE SUEROS DE PACIENTES CON LV*

ANTIGENO: *Leishmania mexicana*
 CONCENTRACION: 8 µg/ml

CONJUGADO: anti IgG humana
 DILUCION: 1:1000

1:100	1:200	1:400	1:500	1:800	1:1000
0.389	0.364	0.340	0.111	0.302	0.401
0.392	0.365	0.333	0.301	0.275	0.370
0.401	0.393	0.344	0.372	0.340	0.373
0.294	0.376	0.381	0.365	0.347	0.350
0.396	0.389	0.376	0.390	0.315	0.301

* LV; leishmaniasis visceral o Kala-azar.

Cuadro No. 6 TITULACION DE SUEROS DE PACIENTES CON LCD*

ANTIGENO: Leishmania mexicana CONJUGADO: anti IgG humana
 CONCENTRACION: 8µg/ml DILUCION: 1:1000

1:100	1:200	1:400	1:500	1:800	1:1000
0.375	0.385	0.378	0.372	0.370	0.364
0.346	0.156	0.376	0.338	0.334	0.369
0.309	0.372	0.279	0.155	0.253	0.379
0.376	0.379	0.348	0.354	0.361	0.358
0.348	0.385	0.389	0.354	0.325	0.190

* LCD; leishmaniasis cutánea diseminada.

Cuadro No. 7 TITULACION DE SUEROS DE PACIENTES CON LCL*

ANTIGENO: Leishmania mexicana CONJUGADO: anti IgG humana
 CONCENTRACION: 8µg/ml DILUCION: 1:1000

1:100	1:200	1:400	1:500	1:800	1:1000
0.142	0.384	0.413	0.381	0.403	0.372
0.2228	0.229	0.155	0.000	0.175	0.382
0.370	0.305	0.385	0.170	0.220	0.254
0.392	0.369	0.348	0.320	0.181	0.000
0.372	0.375	0.332	0.373	0.194	0.018

* LCL; leishmaniasis cutánea localizada.

CUADRO No 8a LECTURAS OBTENIDAS CON Leishmania mexicana
(ANTIGENO ABSORBIDO)

GRUPO SANGUINEO	1:400	1:800
O	0.330	0.330
O	0.172	0.172
A	0.217	0.268
B	0.170	0.279
SUERO POSITIVO	0.429	0.370
SUERO POSITIVO	0.347	0.200

* Se utilizó una concentración de antígeno de 8µg/ml y el conjugado de peroxidasa anti IgG humana a una dilución de 1:1000.

** Los sueros son de personas Rh positivas.

CUADRO 8b LECTURAS OBTENIDAS CON Leishmania mexicana
(ANTIGENO NO ABSORBIDO)

GRUPO SANGUINEO	1:400	1:800
O	0.323	0.250
O	0.302	0.218
A	0.280	0.260
B	0.194	0.287
SUERO POSITIVO	0.321	0.302
SUERO POSITIVO	0.351	0.245

* Se utilizó una concentración de antígeno de 8µg/ml y el conjugado de peroxidasa anti IgG humana a una dilución de 1:1000.

** Los sueros son de personas Rh positivas.

CUADRO 9a

COMPARACION DE LAS ABSORBANCIAS DE SUERO
 ABSORBIDO Y NO ABSORBIDO, CLASIFICADOS DE ACUERDO
 A SU GRUPO SANGUINEO.

DILUCION DE SUERO: 1:400

GRUPO SANGUINEO	SNA	SA
O	a) 0.245 b) 0.365 c) 0.226	a) 0.328 b) 0.341 c) 0.237
O	a) 0.276 b) 0.351 c) 0.177	a) 0.241 b) 0.353 c) 0.186
A	a) 0.341 b) 0.357 c) 0.219	a) 0.085 b) 0.250 c) 0.060
B	a) 0.095 b) 0.202 c) 0.116	a) 0.226 b) 0.301 c) 0.219
SUERO POSITIVO	a) 0.385 b) 0.346 c) 0.343	a) 0.272 b) 0.344 c) 0.321

* Los sueros utilizados son Rh positivo.

** SNA; sueros no absorbidos y SA; sueros absorbidos.

*** Los incisos a pertenecen al antígeno L. mexicana, los incisos b al antígeno L. braziliensis y los c al antígeno L. chagasi.

CUADRO 9b COMPARACION DE LAS ABSORBANCIAS DE SUERO
 ABSORBIDO Y NO ABSORBIDO, CLASIFICADOS DE ACUERDO
 A SU GRUPO SANGUINEO.

DILUCION DEL SUERO: 1:800

GRUPO SANGUINEO	SNA	SA
O	a) 0.186 b) 0.212 c) 0.000	a) 0.220 b) 0.305 c) 0.148
O	a) 0.241 b) 0.316 c) 0.152	a) 0.207 b) 0.264 c) 0.089
A	a) 0.251 b) 0.335 c) 0.168	a) 0.000 b) 0.105 c) 0.049
B	a) 0.072 b) 0.183 c) 0.016	a) 0.112 b) 0.207 c) 0.082
SUERO POSITIVO	a) 0.270 b) 0.335 c) 0.336	a) 0.168 b) 0.290 c) 0.091

- * Los sueros utilizados son Rh positivo.
- ** SNA; sueros no absorbidos y SA; sueros absorbidos.
- *** Los inciso a pertenecen al antígeno L. mexicana, los incisos b al antígeno L. braziliensis y los c al antígeno L. chagasi

En los cuadros 10, 11, 12, 13, 14 y 15, se muestran los resultados de los sueros problema utilizados en la estandarización de la técnica, los sueros son de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada de diferentes regiones del país, utilizando los tres diferentes antígenos: Leishmania mexicana, Leishmania braziliensis y Leishmania chagasi.

Cuadro No.10 RESULTADOS DE ELISA.

ANTIGENO: Leishmania mexicana. DILUCION DE SUERO: 1:400
 CONCENTRACION: 8µg/ml
 CONJUGADO: Anti IgG humana
 DILUCION: 1:1000

1.-0.432	46.-0.558	91.-0.154
2.-0.360	47.-0.435	92.-0.384
3.-0.394	48.-0.546	93.-0.207
4.-0.249	49.-0.624	94.-0.335
5.-0.370	50.-0.285	95.-0.460
6.-0.385	51.-0.400	96.-0.439
7.-0.350	52.-0.639	97.-0.409
8.-0.350	53.-0.391	98.-0.448
9.-0.365	54.-0.000	99.-0.216
10.-0.127	55.-0.260	100.-0.133
11.-0.369	56.-0.303	101.-0.380
12.-0.333	57.-0.448	102.-0.000
13.-0.513	58.-0.379	103.-0.000
14.-0.489	59.-0.412	104.-0.000
15.-0.443	60.-0.269	105.-0.315
16.-0.525	61.-0.483	106.-0.098
17.-0.277	62.-0.003	108.-0.140
18.-0.338	63.-0.475	109.-0.135
19.-0.017	64.-0.433	110.-0.000
20.-0.352	65.-0.507	111.-0.000
21.-0.288	66.-0.441	112.-0.000
22.-0.570	67.-0.591	113.-0.283
23.-0.460	68.-0.529	114.-0.147
24.-0.438	69.-0.291	
26.-0.593	70.-0.006	
27.-0.367	71.-0.464	
28.-0.199	72.-0.305	
29.-0.248	73.-0.545	
30.-0.285	74.-0.231	
31.-0.408	75.-0.331	
32.-0.454	76.-0.602	
33.-0.530	77.-0.167	
34.-0.244	79.-0.589	
35.-0.378	80.-0.491	
36.-0.563	81.-0.362	
37.-0.527	82.-0.444	
38.-0.398	83.-0.242	
39.-0.191	84.-0.336	
40.-0.259	85.-0.647	
41.-0.240	86.-0.374	
42.-0.374	87.-0.278	
43.-0.436	88.-0.491	
44.-0.480	89.-0.186	
45.-0.350	90.-0.180	

Cuadro No.11 RESULTADOS DE ELISA.

ANTIGENO: Leishmania mexicana
 CONCENTRACION: 8 µg/ml
 CONJUGADO: Anti-IgG humana
 DILUCION: 1:1000

DILUCION DE SUERO:1:800

1.-0.347	45.-0.275	91.-0.129
2.-0.350	46.-0.395	92.-0.391
3.-0.332	47.-0.419	93.-0.240
4.-0.347	48.-0.315	94.-0.498
5.-0.287	49.-0.245	95.-0.387
6.-0.217	50.-0.188	96.-0.374
7.-0.253	51.-0.217	97.-0.430
8.-0.434	52.-0.535	98.-0.250
9.-0.437	53.-0.286	99.-0.195
10.-0.125	54.-0.000	100.-0.000
11.-0.394	55.-0.633	101.-0.309
12.-0.125	56.-0.395	102.-0.000
13.-0.350	57.-0.306	103.-0.000
14.-0.385	58.-0.323	104.-0.000
15.-0.283	59.-0.348	105.-0.270
16.-0.434	60.-0.174	106.-0.073
17.-0.217	61.-0.326	107.-0.243
18.-0.248	62.-0.002	108.-0.067
19.-0.000	63.-0.266	109.-0.120
20.-0.254	65.-0.139	110.-0.000
21.-0.325	66.-0.361	111.-0.000
22.-0.588	67.-0.419	112.-0.000
23.-0.173	68.-0.313	113.-0.143
24.-0.311	69.-0.209	114.-0.157
25.-0.507	70.-0.004	
26.-0.390	71.-0.505	
27.-0.321	72.-0.191	
28.-0.228	73.-0.268	
29.-0.169	74.-0.121	
30.-0.280	75.-0.219	
31.-0.256	76.-0.188	
32.-0.267	77.-0.147	
33.-0.313	78.-0.270	
34.-0.241	79.-0.519	
35.-0.228	80.-0.285	
36.-0.350	81.-0.198	
37.-0.383	82.-0.344	
38.-0.391	83.-0.316	
39.-0.352	84.-0.412	
40.-0.215	85.-0.614	
41.-0.240	86.-0.142	
42.-0.207	87.-0.141	
43.-0.388	88.-0.226	
44.-0.402	89.-0.229	
45.-0.275	90.-0.158	

Cuadro No.12 RESULTADOS DE ELISA.

ANTIGENO: Leishmania braziliensis DILUCION DE SUERO:1:400
 CONCENTRACION: 8µg/ml
 CONJUGADO: anti IgG humana
 DILUCION: 1:1000

1.-0.196	46.-0.538	91.-0.005
2.-0.273	47.-0.250	92.-0.276
3.-0.409	48.-0.590	93.-0.093
4.-0.135	49.-0.234	94.-0.123
5.-0.150	50.-0.256	95.-0.256
6.-0.223	51.-0.218	96.-0.279
7.-0.165	52.-0.107	97.-0.507
8.-0.351	53.-0.297	98.-0.315
9.-0.330	54.-0.274	99.-0.365
10.-0.123	55.-0.111	100.-0.202
11.-0.372	56.-0.201	101.-0.477
12.-0.195	57.-0.354	102.-0.305
13.-0.373	58.-0.180	103.-0.433
14.-0.484	59.-0.263	104.-0.400
15.-0.292	60.-0.049	105.-0.272
16.-0.500	61.-0.278	106.-0.246
17.-0.275	62.-0.225	107.-0.202
18.-0.380	63.-0.124	108.-0.177
19.-0.021	64.-0.210	109.-0.382
20.-0.248	65.-0.267	110.-0.358
21.-0.369	66.-0.277	111.-0.430
22.-0.489	67.-0.304	112.-0.258
23.-0.540	68.-0.390	113.-0.343
24.-0.470	69.-0.161	114.-0.235
25.-0.342	70.-0.229	
26.-0.404	71.-0.409	
27.-0.329	72.-0.254	
28.-0.169	73.-0.318	
29.-0.350	74.-0.075	
30.-0.507	75.-0.117	
31.-0.338	76.-0.326	
32.-0.251	77.-0.134	
33.-0.459	78.-0.357	
34.-0.299	79.-0.476	
35.-0.521	80.-0.298	
36.-0.477	81.-0.234	
37.-0.306	82.-0.248	
38.-0.167	83.-0.076	
39.-0.432	84.-0.116	
40.-0.366	85.-0.436	
41.-0.414	86.-0.126	
42.-0.484	87.-0.073	
43.-0.496	88.-0.088	
44.-0.439	89.-0.140	
45.-0.448	90.-0.041	

Cuadro No.13 RESULTADOS DE ELISA.

ANTIGENO: Leishmania braziliensis DILUCION DE SUERO:1:800
 CONCENTRACION: 8µg/ml
 CONJUGADO: anti IgG humana
 DILUCION: 1:1000

1.-0.137	46.-0.349	91.-0.018
2.-0.208	47.-0.379	92.-0.211
3.-0.201	48.-0.551	93.-0.040
4.-0.112	49.-0.097	94.-0.091
5.-0.175	50.-0.209	95.-0.115
6.-0.117	51.-0.130	96.-0.181
7.-0.135	52.-0.000	97.-0.439
8.-0.199	53.-0.118	98.-0.100
9.-0.248	54.-0.223	99.-0.108
10.-0.079	55.-0.185	100.-0.000
11.-0.194	56.-0.277	101.-0.292
12.-0.066	57.-0.269	102.-0.386
13.-0.340	58.-0.191	103.-0.337
14.-0.248	59.-0.159	104.-0.242
15.-0.156	60.-0.039	105.-0.379
16.-0.327	61.-0.249	106.-0.116
17.-0.224	62.-0.144	107.-0.239
18.-0.186	63.-0.257	108.-0.188
19.-0.000	64.-0.250	109.-0.363
20.-0.147	65.-0.000	110.-0.460
21.-0.288	66.-0.118	111.-0.386
22.-0.452	67.-0.279	112.-0.370
23.-0.435	68.-0.218	113.-0.278
24.-0.354	69.-0.031	114.-0.108
25.-0.275	70.-0.165	
26.-0.221	71.-0.363	
27.-0.180	72.-0.043	
28.-0.252	73.-0.161	
29.-0.220	74.-0.007	
30.-0.332	75.-0.099	
31.-0.237	76.-0.000	
32.-0.178	77.-0.034	
33.-0.344	78.-0.091	
34.-0.275	79.-0.349	
35.-0.224	80.-0.099	
36.-0.430	81.-0.062	
37.-0.166	82.-0.182	
38.-0.135	83.-0.029	
39.-0.335	84.-0.022	
40.-0.291	85.-0.412	
41.-0.466	86.-0.081	
42.-0.431	87.-0.000	
43.-0.357	88.-0.178	
44.-0.361	89.-0.107	
45.-0.349	90.-0.020	

Cuadro No.14 RESULTADOS DE ELISA

ANTIGENO: Leishmania chagasi
 CONCENTRACION: 8µg/ml
 CONJUGADO: anti IgG humana
 DILUCION: 1:1000

DILUCION DE SUERO:1:400

1.-0.388	46.-0.241	91.-0.189
2.-0.205	47.-0.086	92.-0.377
3.-0.324	48.-0.366	93.-0.292
4.-0.337	49.-0.316	94.-0.209
5.-0.085	50.-0.270	95.-0.322
6.-0.186	51.-0.365	96.-0.386
7.-0.401	52.-0.271	97.-0.247
8.-0.377	53.-0.322	98.-0.264
9.-0.377	54.-0.412	99.-0.360
10.-0.062	55.-0.265	100.-0.262
11.-0.199	56.-0.430	101.-0.360
12.-0.267	57.-0.441	102.-0.353
13.-0.446	58.-0.259	103.-0.166
14.-0.415	59.-0.370	104.-0.300
15.-0.293	60.-0.395	105.-0.166
16.-0.417	61.-0.431	106.-0.039
17.-0.231	62.-0.413	107.-0.244
18.-0.266	63.-0.353	108.-0.333
19.-0.034	64.-0.430	109.-0.233
20.-0.199	65.-0.283	110.-0.260
21.-0.425	66.-0.307	111.-0.284
22.-0.393	67.-0.454	112.-0.229
23.-0.452	68.-0.322	113.-0.271
24.-0.254	69.-0.242	114.-0.200
25.-0.394	70.-0.377	
26.-0.357	71.-0.355	
27.-0.304	72.-0.329	
28.-0.088	73.-0.430	
29.-0.187	74.-0.155	
30.-0.381	75.-0.433	
31.-0.271	76.-0.256	
32.-0.258	77.-0.306	
33.-0.276	78.-0.383	
34.-0.278	79.-0.446	
35.-0.277	80.-0.238	
36.-0.318	81.-0.400	
37.-0.104	82.-0.380	
38.-0.249	83.-0.163	
39.-0.283	84.-0.220	
40.-0.259	85.-0.439	
41.-0.179	86.-0.151	
42.-0.254	87.-0.109	
43.-0.330	88.-0.229	
44.-0.221	89.-0.281	
45.-0.179	90.-0.264	

Cuadro No.15 RESULTADOS DE ELISA.

ANTIGENO: Leishmania chagasi
 CONCENTRACION: 8µg/ml
 CONJUGADO: anti IgG humana
 DILUCION: 1:1000

DILUCION DE SUERO:1:800

1.-0.246	46.-0.055	91.-0.036
2.-0.140	47.-0.022	92.-0.172
3.-0.137	48.-0.278	93.-0.171
4.-0.185	49.-0.279	94.-0.224
5.-0.000	50.-0.187	95.-0.270
6.-0.087	51.-0.216	96.-0.246
7.-0.352	52.-0.095	97.-0.114
8.-0.286	53.-0.193	98.-0.174
9.-0.263	54.-0.322	99.-0.184
10.-0.000	55.-0.152	100.-0.130
11.-0.027	56.-0.408	101.-0.330
12.-0.097	57.-0.400	102.-0.202
13.-0.410	58.-0.250	103.-0.027
14.-0.326	59.-0.339	104.-0.218
15.-0.120	60.-0.365	105.-0.094
16.-0.330	61.-0.424	106.-0.002
17.-0.110	62.-0.278	107.-0.081
18.-0.226	63.-0.230	108.-0.202
19.-0.000	64.-0.415	109.-0.015
20.-0.125	65.-0.130	110.-0.156
21.-0.358	66.-0.262	111.-0.185
22.-0.295	67.-0.424	112.-0.155
23.-0.387	68.-0.311	113.-0.302
24.-0.174	69.-0.125	114.-0.062
25.-0.275	70.-0.219	
26.-0.146	71.-0.365	
27.-0.226	72.-0.304	
28.-0.005	73.-0.261	
29.-0.066	74.-0.081	
30.-0.156	75.-0.279	
31.-0.208	76.-0.088	
32.-0.179	77.-0.212	
33.-0.200	78.-0.193	
34.-0.177	79.-0.385	
35.-0.192	80.-0.200	
36.-0.230	81.-0.256	
37.-0.034	82.-0.228	
38.-0.295	83.-0.275	
39.-0.157	84.-0.155	
40.-0.128	85.-0.437	
41.-0.058	86.-0.162	
42.-0.093	87.-0.000	
43.-0.255	88.-0.082	
44.-0.113	89.-0.202	
45.-0.062	90.-0.106	

En los cuadros 16, 17 y 18 se muestran los resultados obtenidos por la técnica de ELISA en relación a la titulación por IFI.

Cuadro No. 16 RELACION DE RESULTADOS OBTENIDOS POR LAS
 TECNICAS DE ELISA E IFI.
 Leishmania mexicana.

Diluciones del suero en IFI				
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
0.432	0.127	0.394	0.385	0.558
0.360	0.513	0.249	0.350	0.384
0.525	0.443	0.370	0.350	0.207
0.017	0.277	0.365	0.369	
0.530	0.338	0.333	0.482	
0.244	0.352	0.288	0.248	
0.378	0.460	0.438	0.191	
0.285	0.408	0.367	0.374	
0.488	0.530	0.199	0.441	
0.269	0.259	0.472	0.468	
0.529	0.240	0.454	0.487	
0.231	0.436	0.480	0.444	
0.331	0.350	0.400	0.248	
0.602	0.624	0.379	0.614	
	0.391	0.412	0.154	
	0.260	0.483	0.460	
	0.006	0.475		
	0.336	0.433		
	0.245	0.507		
	0.186	0.291		
		0.305		
		0.545		
		0.162		
		0.491		
		0.242		
		0.627		
		0.180		

Cuadro No. 17 RELACION DE RESULTADOS OBTENIDOS POR
 LAS TECNICAS DE ELISA E IFI.
Leishmania braziliensis.

Diluciones del suero ocupadas en IFI				
1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
0.196	0.123	0.409	0.223	0.538
0.273	0.373	0.135	0.165	0.276
0.500	0.292	0.150	0.351	0.093
0.21	0.275	0.330	0.372	
0.342	0.380	0.195	0.484	
0.299	0.248	0.369	0.277	
0.521	0.540	0.470	0.409	
0.256	0.338	0.329	0.357	
0.324	0.459	0.169	0.248	
0.049	0.336	0.507	0.073	
0.390	0.414	0.251	0.088	
0.075	0.496	0.439	0.005	
0.117	0.448	0.218	0.256	
0.326	0.234	0.180		
	0.297	0.263		
	0.11	0.278		
	0.229	0.124		
	0.116	0.210		
	0.126	0.267		
	0.140	0.161		
		0.254		
		0.318		
		0.134		
		0.298		
		0.076		
		0.436		
		0.041		

Cuadro No. 18 RELACION DE RESULTADOS OBTENIDOS POR LAS
TECNICAS DE ELISA E IFI.
Leishmania chagasi.

1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
0.388	0.062	0.324	0.186	0.241
0.205	0.446	0.337	0.401	0.377
0.417	0.293	0.085	0.377	0.292
0.034	0.231	0.377	0.199	
0.394	0.266	0.267	0.415	
0.278	0.199	0.425	0.187	
0.277	0.452	0.254	0.283	
0.270	0.271	0.304	0.254	
0.441	0.276	0.088	0.307	
0.395	0.259	0.381	0.355	
0.322	0.179	0.258	0.383	
0.155	0.330	0.221	0.380	
0.433	0.179	0.365	0.109	
0.256	0.316	0.259	0.229	
	0.622	0.370	0.189	
	0.265	0.431	0.322	
	0.370	0.353		
	0.220	0.430		
	0.151	0.283		
	0.281	0.242		
		0.329		
		0.430		
		0.306		
		0.238		
		0.163		
		0.439		
		0.264		

*La dilución del suero es 1:400 para la técnica de ELISA, en las tres tablas se maneja la misma dilución.

** Las diluciones de IFI nos indican que el suero es positivo a Leishmania sp.

En los cuadros 19, 20 y 21 se muestran las tablas de ANDEVA para la regresión de los resultados de ELISA para las diferentes cepas de *Leishmania*, después de realizar un análisis estadístico de regresión lineal donde no se observó correlación entre las mismas.

De igual forma las tablas 22, 23 y 24 presentan las tablas de ANDEVA entre los resultados de ELISA e IFI.

Cuadro No. 19 TABLA DE ANADIVA DE REGRESION CONFRONTANDO RESULTADOS DE ELISA
 PARA Leishmania mexicana Y Leishmania braziliensis.

REGRESION	2-1=1	$SCR = n \sum (xy) - \sum x \cdot \sum y - (\sum x)^2 / n$ $4.6679 + 1.88452 - 6.1743 =$ 0.3780	SCR / β $0.3780 / 1 =$ 0.3780	$SCR / SCr =$
ERROK	n-2 = 78	$SCrr = \sum y^2 - n \sum (xy) - \sum y$ $7.6824 - 4.6679 - 1.88452 = 1.1300$	SCR / β $1.1300 / 78 = 0.014487$	$\frac{0.3780}{0.14487} = 26.09$

x= Suma de valores obtenidos con Leishmania mexicana

y= Suma de valores obtenidos con Leishmania braziliensis

$$s = \frac{(\sum y - n \sum x)}{n} = 0.00000$$

$$u = \frac{(n \sum xy - \sum x \cdot \sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 0.5233$$

n=80

$$Fritico = (s, 1, n-2, \alpha = 0.005)$$

Si $F_{cal} \geq F_{crit}$ No existe diferencia significativa entre el uso de la cepa de Leishmania mexicana y Leishmania braziliensis en la técnica de ELISA.

Si $F_{cal} \leq F_{crit}$ Existe diferencia significativa entre el uso de la cepa de Leishmania mexicana y Leishmania braziliensis en la técnica de ELISA.

$F_{cal} \geq F_{crit}$

26.0911 \geq 4.00 No existe diferencia significativa entre el uso de la cepa de Leishmania mexicana y Leishmania braziliensis en la técnica de ELISA.

Cuadro No. 20 TABLA DE ANADIVA DE REGRESION CONTRONTANDO RESULTADOS DE ELISA PARA Lichimania brasiliensis y Lichimania chagasi.

REGRESION	1	$1.6378+5.6520-6.810 = 0.4991$	0.4991	F _{cal} = $\frac{0.1921}{0.0032} = 151.81$
ERROR	78	$7.5662-1.6578-5.6520 = 0.2564$	$0.2564/78 = 0.0032874$	

y = Suma de los valores obtenidos con Lichimania chagasi

x = Suma de los valores obtenidos con Lichimania brasiliensis

$$b = 0.2245$$

$$a = 0.2421$$

$$n = 80$$

Si $F_{calc} \geq F_{crit}$ No existe diferencia significativa entre el uso de la copa de Lichimania brasiliensis y Lichimania chagasi en la técnica de ELISA.

Si $F_{calc} \leq F_{crit}$ Existe diferencia significativa entre el uso de la copa de Lichimania brasiliensis y Lichimania chagasi en la técnica de ELISA.

$F_{calc} \geq F_{crit}$

$151.8192 \geq 4.00$ No existe diferencia significativa entre el uso de la copa de Lichimania brasiliensis y Lichimania chagasi en la técnica de ELISA.

Cuadro No. 21 TABLA DE ANADEVA DE REGRESION CONFRONTANDO RESULTADOS DE ELISA
PARA Leishmania mexicana Y Leishmania chagasi.

REGRESION	1	$2.9855 + 4.0167 - 6.8557 =$ 0.1466	0.1466	0.1466 - 19.099 0.0077
ERROR	78	$7.6012 - 2.9855 - 4.0169 =$ 0.5988	$0.5988/78 =$ 0.007677	

x = suma de valores obtenidos con Leishmania mexicana.

y = suma de valores obtenidos con Leishmania chagasi.

b = 0.32601

m = 0.17152

n = 80

Si $F_{calc} \geq F_{crit}$ No existe diferencia significativa entre el uso de la copa Leishmania mexicana y Leishmania chagasi en la técnica de ELISA.

Si $F_{calc} \leq F_{crit}$ Existe diferencia significativa entre el uso de la copa Leishmania mexicana y Leishmania chagasi en la técnica de ELISA.

$t_{calc} \geq t_{crit}$

19.0949 \geq 4.00 No existe diferencia significativa entre el uso de la copa de Leishmania mexicana y Leishmania chagasi en la técnica de ELISA.

Cuadro No. 22 TABLA DE ANADÉVA PARA LA REGRESION.
IFI Y ELISA (Leishmania braziliensis)

REGRESION	1	$0.1829 + 3.6769 - 3.8577 =$ 0.001086	0.2086	$0.02086/0.02132 =$ 0.0933
ERROR	78	$5.6035 - 0.1029 - 3.6769 =$ 1.7437	$1.7437/78 =$ 0.02132	

x = Suma de los resultados obtenidos por la técnica de IFI.

y = Suma de los valores obtenidos con Leishmania braziliensis.

$$b = 0.2093$$

$$m = 0.03709$$

$$n = 80$$

Si $F_{calc} \geq F_{crit}$ No existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los métodos ELISA e IFI, para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania braziliensis.

Si $F_{calc} \leq F_{crit}$ Existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los métodos ELISA e IFI, para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania braziliensis.

$$F_{calc} \leq F_{crit}$$

$0.0933 \leq 4.00$ Existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los métodos ELISA e IFI, para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania braziliensis.

Cuadro No. 23 TABLA DE ANADÉVA PARA LA REGRESION
IFI vs ELISA (Leishmania chagasi)

			REGRESION	
REGRESION	1	$-0.6568 + 38.7171 \cdot X - 3.9791 =$ 34.081	34.081	0.1232
ERROR	78	$5.6167 - (-0.6568) - 38.7171 =$ 32.4436	$32.4436 \cdot 78 =$ 0.415°	

$X =$ Suma de los resultados obtenidos por la técnica de IFI.

$Y =$ Suma de los valores obtenidos con Leishmania chagasi.

$b = 0.1997$

$w = 0.08496$

$n = 80$

Si $F_{cal} \geq F_{crit}$ No existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los métodos ELISA e IFI, para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania chagasi.

Si $F_{cal} \leq F_{crit}$ Existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los métodos ELISA e IFI, para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania chagasi.

$F_{cal} \leq F_{crit}$

$0.1232 \leq 4.00$ Existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los métodos ELISA e IFI, para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania chagasi.

Cuadro No. 24 TABLA DE ANADAVA PARA LA REGRESION.
IFI Y ELISA (Leishmania mexicana)

REGRESION	1	$-0.3036 + 4.2872 - 3.9805 =$ 3.049×10^3	3.049×10^3	$\frac{3.049 \times 10^3}{0.0225} = 0.1355$
ERROR	78	$5.7302 - (-0.3036) - 4.2872 =$ 1.7556	$1.7556/78 =$ 0.02250	

$x =$ Suma de los resultados obtenidos por la técnica de IFI.

$y =$ Suma de los valores obtenidos con Leishmania mexicana

$b = 0.24024$

$a = -0.0467$

$n = 80$

Si $F_{calc} \geq F_{crit}$ No existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los dos métodos ELISA e IFI, para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania mexicana.

Si $F_{calc} \leq F_{crit}$ Existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los métodos ELISA e IFI para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania mexicana.

$F_{calc} \leq F_{crit}$

$0.1355 \leq 4.00$ Existe diferencia significativa en el uso de cualquiera de los métodos ELISA e IFI, para el diagnóstico de leishmaniasis, utilizando como antígeno Leishmania mexicana.

DISCUSION DE RESULTADOS

Como se puede observar en los cuadros 4, 5, 6, y 7 varios sueros de individuos sanos, los cuales no habían estado en zonas endémicas de leishmaniasis (testigos negativos), presentaron absorbancias en la técnica de ELISA similares a las que dieron los sueros positivos. Estos falsos positivos se debieron a la presencia de isoaglutininas anti grupo sanguíneo A y/o B, los cuales como se sabe reconocen por reacción cruzada a, antígenos de carbohidratos presentes en las leishmanias^{1,8}, proponemos lo anterior debido a que dichos sueros perdieron su reactividad cruzada cuando se absorbieron con glóbulos rojos del grupo sanguíneo A y/o B. Por otro lado sabemos que los carbohidratos presentes en las leishmanias, que son reconocidos por las isoaglutininas, no están libres, ya que no pudimos adsorberles la inespecificidad, mediante la técnica de Kabat¹⁷, que utiliza glóbulos rojos de carnero los que son capaces de absorber carbohidratos libres inespecíficamente.

Como se puede observar en los cuadros 21, 22, y 23, el análisis de ANADEVA para la regresión entre las técnicas IFI y ELISA, se observa que hay una asociación muy pobre entre estas dos técnicas, esto se debe a que mientras en la técnica de IFI se usa el parásito completo (se determinan antígenos de superficie), en la técnica de ELISA el antígeno usado es soluble, es decir, tanto IFI como ELISA determinan diferentes tipos de antígenos, por eso su correlación es mala. Estos análisis son consistentes haciendo las técnicas de ELISA con antígenos de las tres especies de *Leishmanias* (*L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. chagasi*); sin embargo cuando se hace el análisis, mediante la técnica de ELISA, usando los tres antígenos de leishmanias se observa que no hay diferencia en las tres técnicas de ELISA cuadros 18, 19 y 20, aún cuando su realización sea a diferentes tiempos y por diferentes personas, lo cual nos indica que esta técnica es reproducible. Esta reproducibilidad de la técnica de ELISA se puede deber a que el antígeno lo tratamos con formalina al 0.1% que no modifica epítopes y lo estabiliza⁵⁴; y además adicionamos timerozal al 0.01% para prevenir contaminación microbiana.

Consideramos que nuestra técnica debe ser mejorada tratando de eliminar de los antígenos solubles de leishmanias, los carbohidratos que cruzan con los carbohidratos de grupos sanguíneos A y B, mediante el empleo de inmuoabsorbentes y por otro lado creemos que es necesario implementar una ELISA utilizando como antígeno el parásito completo, es decir determinar antígenos de superficie y con esto creemos que se mejora la correlación de esta técnica con él.

CONCLUSIONES

Las leishmaniasis requieren de métodos seguros y rápidos para su diagnóstico, ya que generalmente la severidad de la enfermedad está relacionada con el diagnóstico oportuno y la especie o subespecie que está infectando.

Se concluye que:

- Se estandarizó la técnica de ELISA para el diagnóstico de leishmaniasis, encontrándose que: la concentración óptima de antígeno es 8 $\mu\text{g/ml}$, la dilución de conjugado 1:1000 y la de suero 1:400.

- Una vez estandarizada la técnica de ELISA, es posible realizar el diagnóstico de manera rápida y específica.

- Existe reproducibilidad de los resultados, sin que estos tengan variaciones significativas, cuando es realizada por otra persona o con diferente equipo. Siempre y cuando se mantengan las condiciones de la estandarización.

- La sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Leishmaniasis no depende de la especie ni de la zona endémica de donde proviene el antígeno.

- Se encontró diferencia significativa entre el empleo de la técnica de ELISA e IFI respecto al diagnóstico de esta parasitosis.

APENDICE

Azul de Evans (solución madre; dilución 1:1000)

Azul de Evans	0.1 g
Aforar con agua destilada	100.0 ml

Solución salina isotónica

Cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1000.0 ml

Cuantificación de Proteínas ¹⁸

Reactivo A

Carbonato de sodio al 2%
Tartrato de sodio y potasio al 0.02%
Hidróxido de sodio 0.1N

Reactivo B

Sulfato de cobre al 0.5% en agua

Reactivo C

50ml A + 1 ml B

Reactivo D

Folin-Ciocalteau.

PBS (regulador de fosfatos)

Cloruro de sodio (NaCl)	8.0 g
Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)	2.9 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	0.2 g
Aforar con agua destilada	1000.0 ml

PBS-Tween 0.05%

Tween 20	50.0 μ l
PBS	100.0 ml

Regulador de recubrimiento (Carbonatos)

Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	1.59 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	0.2293 g
Aforar con agua destilada	100.0 ml
Estabilidad máxima dos semanas	

Medio de Novy-Nicolle-McNeal (NNN)

El agar se obtiene calentando juntos los siguientes ingredientes:

Agar	1.4 g
NaCl	0.6 g
Agua destilada	90 ml

Método. Caléntese el contenido del matraz hasta que el agar se funde; manténgase bien mezclado el contenido para que el agar no se queme en la parte inferior del matraz. Transfírase directamente la cantidad apropiada de agar fundido a los recipientes de cultivo. Esterilícese el agar manteniendo los tubos de cultivo en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Déjese enfriar el agar hasta unos 50°C y agréguese sangre de conejo desfibrinada, obtenida en condiciones de asepsia, hasta alcanzar una concentración de alrededor del 15%. La sangre se mezcla con el agar haciendo rodar los tubos entre las manos, en posición vertical. Luego, los tubos se colocan en posición inclinada hasta que el agar se solidifica y a continuación se ponen de nuevo en posición vertical se colocan a prueba de esterilidad a 37°C por 24 horas, finalmente se guardan en refrigeración.

Caldo BHI (Infusión de cerebro y corazón)

Infusión de cerebro y corazón	6.0 g
Peptona de carne	6.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Dextrosa	3.0 g
Peptona de gelatina	14.5 g
Fosfato disódico	2.5 g
Agua destilada	1000.0 ml
pH final 7.4 ± 0.2	

Suspender 37 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto hasta disolución completa. Distribuir y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640

Medio de cultivo RPMI (SIGMA)

Carbonato de sodio	2.0 g
Penicilina	50 U/ml
Estreptomictina	50 µg/ml
Agua destilada	1000 ml

Se pesa el bicarbonato de sodio y el RPMI se disuelven en 700 ml de agua destilada, y se pasa por filtro grueso, posteriormente se esteriliza por filtración a través de una membrana de 0.22 en condiciones de esterilidad. Se le agrega el antibiótico y se suplementa con hemoglobina al 10%.

• Leishmania chagasi se suplementa al 15%

SUGERENCIAS

- Se recomienda determinar el grupo sanguíneo del paciente antes de realizar el diagnóstico de leishmaniasis por la técnica de ELISA, para evitar dar falsos positivos ó falsos negativos.
- Tener mucho cuidado al realizar la técnica de ELISA, especialmente durante los lavados de la placa, ya que este es un paso importante e influye en los resultados.
- Buscar antígenos específicos para eliminar la reacción cruzada encontrada en este sistema
- Eliminar los carbohidratos presentes en el antígeno de *Leishmania mexicana*, que creemos son los que intervienen en la cruz-a antígenica, mediante una columna de Concanavalina-A.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguilar T.F. Reactividad cruzada un problema de inespecificidad en el serodiagnóstico de Leishmaniasis cutánea. *Inv. Biol.* 1993; 1: 22-29.
- 2.- Alexander J. and Russell D.J. Parasite antigens their role in protection diagnostic and escape: The leishmaniasis. *Curr. Trop. in Microb. and Immun.* 1985; 120: 46-67.
- 3.- Anthony R.L. Christensen H.A. and Johnson C.A. ELISA for the serodiagnosis of new world Leishmaniasis *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990: 29:72-78
- 4.- Arif R. Osman D.R. Las leishmaniasis ever cured. *Trop. Med. and Hyg.* 1992; 86:251-253
- 5.- Babejev O.G. et. al. Treatment of cutaneous leishmaniasis using a carbon dioxide laser. *Bull. WHO.* 1991; 76: 103-106.
- 6.- Badaró R.S., Reed S.G., Barral A. and Jones T.C. Evaluation of the micro enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1986; 35:72-78.
- 7.- Badaró R.S., Reed S.G. and M. Carvalho E. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; 32 (3):480-484.
- 8.- Bastida Tabau E., Sans Sabrafen J., Besses Raebel C. y col. *Hematología clínica*. 2a. ed. España : Doyna. 1988; 90-96.
- 9.- B.E. Doid and P.J. Lincoln. *Inmunología de los grupos sanguíneos*. México. El manual moderno. 1976: 18-38.
- 10.- Blum.J.J. Intermedary metabolism of Leishmania. *Parasitol today.* 1993; 9:118-121.
- 11.- Blagi. F. *Enfermedades parasitarias* 2a. ed. México: La prensa mexicana. 19: 111-119.

- 12.- Claude C. Cathien S. and col. Immunology responsiveness in American cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* 1992; 4:3100-3105.
- 13.- Chang K.P. and Chaudhuri G. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Ann. Rev. Microbiol.* 1990; 44: 499-529.
- 14.- Chose A.C., Haldar J.P., Pal S.C., Covit J., Pinardi M.E. and Rondon A.J. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans. Med. Hyg.* 1972; 66: 603-610.
- 15.- Davidson R.N. and Croft S.L. Recent advances in the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans. Med. and Hyg.* 1993; 87:130-131.
- 16.- Dubory R.E. and Sadum H.E. Fluorescent antibody test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 1993; 1:541-548.
- 17.- Evans G.T., Smith D. and Pearson D.R. Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.* 1990; 76:212-217
- 18.- Faust E.C., Russell P.F. and Jung Rodney C. *Parasitologia clinica*. Barcelona: Salvat editores. 1974: 83-92.
- 19.- Garcia M., Andrade N. y col. Localized cutaneous leishmaniasis (chiclero's ulcer) in México: sensitivity and specificity ELISA for IgG antibodies to *Leishmania mexicana mexicana*. *Trin. Trop. Med. Hyg.* 1989; 84:180-185.
- 20.- G.E. Thomas and P.D. Robert. Humoral factor and nonspecific immune suppression in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.* 1988; 76:212-221.
- 21.- Greenblat Ch.L., Dark J.D., Schur L. and Slutsky G. Do *Leishmania* serotypes mimic human blood group antigens. *The Lancet* 1981; 1:23
- 22.- Haldaris C.G., Boventre P.F. Efficacy of combined immunostimulation and chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis *Parasitol.* 1983; 32: 286-295.

- 23.- Handman E., Graham F.M. and Godby J.W. Identification of characterization of protein antigens of *Leishmania tropica* isolates. *J. Immunol.* 1991; 2:508-512.
- 24.- Herrera B.F. y cols. ELISA análisis de aplicación en *Infectología clínica*. *Rev. Enf. Inf. en Ped.* 1989; 2: 83-89.
- 25.- Herzenberg. Blackwell. *Handbook of experimental immunology and immunochemistry* 4a. ed. Inglaterra: Blackwell scientific publishers 1986; 1:27.1-27.20
- 26.- Hurt E. F.G. Mitchell and James W. Identificación y caracterización de protein antigens of *Leishmania tropica* isolates. *J. Immunol.* 1981; 2: 508-512.
- 27.- Ibañez B. S. Los dípteros hematofagos en México IV Simp. Nal. Entomol. Med. Vet. 1989: 81-89.
- 28.- J. Malcom. A.C Tara. The glycoconisol phospholipids of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. *J. Biol. Chem.* 1993; 266: 15595-15604.
- 29.- Kabat A. *Inmunquímica experimental*. México: Prensa mexicana. 1968:111-119.
- 30.- Kretzler R.D., Christensen H.A. Characterization of *Leishmania* spp by multiple isoenzyme electrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1980; 29: 199 -208.
- 31.- Lalson R. The American leishmaniasis: some observations on there ecology and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1983; 77: 569-596.
- 32.- Lowry O.H., Rosebrough N.J. and Lowry Folin. Protein determination *J. Biol. Chem.* 1951:193-265.
- 33.- Manenti S., Kubier S., Rascon A. and G. Hernández A. Biochemical evidence of the antigenic cell surface heterogeneity of *Leishmania mexicana*. *Parasitol. Res.* 1990; 76:301-305.
- 34.- M.O. Amalia. Relación huésped parásito en leishmaniasis. *Infectol.* 1986; 7:230-236.
- 35.- OPS-OMS. Informe de la reunión de trabajo sobre la quimioterapia de las leishmaniasis mucocutáneas. Brasilia 1989.

- 36.- P. Scott, N. Patricia, L.L. Roffman and S. Alan. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med.* 1988; 168:1675-1988.
- 37.- P. Wierath, T. Godman and C. Eysal. Leishmaniasis control strategies. *Parasitol.* 1992; 8:249-251.
- 38.- Richard and L. Jaques. Immunology of leishmaniasis. *J. Immunol.* 1992; 4:413-418.
- 39.- Rieux J.A. Animal reservoir of *Leishmania*. Meeting on the epidemiological and public health aspects of leishmaniasis in countries bordering the mediterranean sea. 1984
- 40.- Rolit I.B. and Jonathan M. David. *Inmunología 2a. ed. España: Salvat* 1991:254-256.
- 41.- Rose N.R., Friedman H., Fahey J.L. *Manual of clinical immunology 3a. ed. Washington D.C. American society for microbiology.* 1986:414-426, 484-489 y 798-807.
- 42.- S.H. Glavin. Effects of ultraviolet B radiation on cutaneous leishmaniasis. *Parasitol.* 1993; 8:44-48.
- 43.- Slites D.P., Slob J.D. and Wells J.V. *Basic and clinical immunology 6th. ed. Norwalk. Conn appleton lange.* 1987.
- 44.- The control of leishmaniasis. Report of a who expert committee. Technical report series 1990; 79.
- 45.- The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Bull. world health organ.* 1976; 54:129-139.
- 46.- Trapp G. R. and Dawson S.B. *Biostatística médica. El manual moderno.* 1993:187-212.
- 47.- Velasco Castrejón O. Las leishmaniasis en México. *Rev. Microbiol.* 1987; 29:119-126.
- 48.- Velasco Castrejón O. Las leishmaniasis con especial referencia a México. *Publicación técnica del INDRE.* 1991.
- 49.- Velasco Castrejón O. Los agentes etiológicos de las leishmaniasis en México; presencia de *Leishmania braziliensis*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 1989; 31:231-234.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 50.- Wayne W.D. *Biostatística 3a.ed.* México: Limusa. 1993:283-412.
- 51.- Weir D.M. *Handbook of experimental immunology 4a.ed.* Blackwell scientific publications. 1986.
- 52.- Anayo F.G., Guptill D. Use of antigen preparation of the amastigote stage of Trypanosoma cruzi in the serology of Chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1984; 33: 362-371.