

Biomédica 2010;30:39-45

ARTÍCULO ORIGINAL

Herramientas no invasivas en Venezuela: comparación entre las pruebas inmunoserológicas DAT, rK26 y rK39 en el diagnóstico de leishmaniasis visceral*

Guillermo Terán-Ángel¹, Vestalia Rodríguez¹, Rosilved Silva^{1,2}, Olga Zerpa¹, Henk Schallig³,
Marian Ulrich[†], Maira Cabrera¹

¹ Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

² Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³ Koninklijk Instituut voor de Tropen-Royal Tropical Institute, Biomedical Research, Amsterdam, The Netherlands

[†] *In memoriam* de Marian Ulrich, quien falleció luego de la culminación de este trabajo.

Introducción. La leishmaniasis visceral constituye un problema de salud pública en los países en donde es endémica por ser potencialmente letal, principalmente en niños. El diagnóstico rápido es importante en el control de la enfermedad.

Objetivo. Comparar las pruebas inmunocromatográficas rK39 (*rK39 dipstick*, Kalazar detect test, Inbios Internacional Inc.), ELISA rK26 y la prueba de aglutinación directa (*Kit Biomedical Research*) en relación con la prueba de ELISA rK39, como herramientas serodiagnósticas para la leishmaniasis visceral en Venezuela.

Materiales y métodos. Se estudiaron 50 muestras séricas de pacientes positivos por la prueba ELISA rK39, provenientes de diferentes zonas endémicas: Nueva Esparta, Lara, Anzoátegui y Trujillo; se incluyeron 17 muestras de voluntarios sanos y 25 de pacientes con otras enfermedades. Se utilizó la prueba ELISA rK39 como método de referencia, considerándola como patrón de referencia imperfecto, a partir del cual se determinaron los valores de sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud y valores diagnóstico positivo y negativo en las demás pruebas evaluadas.

Resultados. Todas las pruebas mostraron una fuerte correlación ($p < 0,0001$) con la ELISA rK39. La aglutinación directa y la prueba inmunocromatográfica rK39 presentaron altos valores de sensibilidad, 89,74% (IC95% 81,34-98,15) y 94,15% (IC95% 87,65-100), respectivamente, y de especificidad, 81% (IC95% 79,96-99,51) y 100% (IC95% 100-100). La prueba ELISA rK26, a pesar de poseer buena especificidad, 99% (IC95% 95,17-100), tuvo baja sensibilidad, 37% (IC95% 23,41-50,15).

Conclusión. Las pruebas de aglutinación directa y la prueba inmunocromatográfica rK39 presentaron los mayores valores de sensibilidad y especificidad. Ambas son simples, económicas y fácilmente aplicables. Por ello, son recomendables para efectuar un diagnóstico de leishmaniasis visceral eficaz y precoz en Venezuela.

Palabras clave: leishmaniasis visceral/diagnóstico, pruebas de aglutinación, prueba ELISA, cromatografía en papel, *Leishmania infantum*, humanos, Venezuela.

Non invasive diagnostic tools for visceral leishmaniasis: a comparison of the immunoserological tests DAT, rK26 and rK39

Introduction. Human visceral leishmaniasis is a serious public health problem in endemic countries because of its high potential lethality, particularly in children. Rapid diagnosis is essential to early treatment and control of visceral leishmaniasis.

Objective. The aim was to compare three serodiagnostic tools for human visceral leishmaniasis.

Materials and methods. Three methods were compared: the rK39 dipstick (Kalazar detection test, Inbios International Inc.), ELISA rK26 and direct agglutination test (DAT) (KIT Biomedical Research). Fifty serum samples from patients positive for rK39 ELISA were compared from four endemic provinces in Venezuela: Nueva Esparta (Margarita island), Lara, Anzoátegui and Trujillo. Additional serum samples from 17 healthy volunteers and 25 patients with other diseases were included. The rK39 ELISA served as the baseline standard method. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and likelihood ratio were calculated for each test.

Results. All methods had a positive correlation with rK39 ELISA ($p < 0,0001$). They showed high sensitivity and specificity. The direct agglutination test and the rK39 dipstick showed high sensitivity values, 89.7% (95% CI: 81.34-98.2%) and 94.2% (95% CI: 87.7-100%), respectively, and high specificity, 81.0% (95% CI: 80.0-99.5%) and 100%. The rK26 ELISA showed good specificity, 99% (95% CI: 95.2-100%), but a very low sensitivity, 37% (95% CI: 23.4-50.2%).

Conclusion. Overall results indicated that DAT and rK39 dipstick have the highest specificity and sensitivity. Both are simple, cost-effective and field applicable tests. Therefore, they are recommended for early and accurate diagnosis of visceral leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, visceral/diagnosis; agglutination tests, enzyme-linked immunosorbent assay; chromatography, paper; *Leishmania infantum*, humans, Venezuela.

La leishmaniasis visceral es una enfermedad causada por *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*. Es considerada una enfermedad crónica con alto potencial de letalidad y el éxito de su curación depende del diagnóstico temprano y de la instauración de la terapéutica de forma oportuna y precoz (1-3).

Anualmente, a nivel mundial se reportan alrededor de 500.000 nuevos casos (4). En Venezuela, la tasa de incidencia anual de leishmaniasis visceral ha oscilado entre 0,11 y 0,27 por cada 100.000 habitantes, desde el año 2000 al 2003 (3).

El diagnóstico de la leishmaniasis visceral se determina según los antecedentes epidemiológicos del paciente, la clínica, la visualización directa del parásito y los resultados de las pruebas serológicas. Entre las pruebas diagnósticas de laboratorio están los métodos de identificación del parásito y las pruebas inmunológicas (5). Las primeras se consideran el método de referencia para el diagnóstico, siendo los aspirados esplénicos más sensibles que los aspirados de médula ósea o ganglio linfático. Sin embargo, las dificultades para obtener y examinar estos tejidos han hecho que se incremente el uso de los métodos serológicos (6).

En Venezuela, de acuerdo con los lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud (5), las pruebas serológicas constituyen las pruebas confirmatorias que apoyan el diagnóstico clínico y epidemiológico. De éstas, la prueba ELISA rK39 se usa de rutina en nuestro país para la confirmación del diagnóstico.

Sin embargo, esta prueba no es de fácil ejecución en las zonas remotas donde la leishmaniasis visceral es endémica, porque requiere de equipos y personal especializados. Por ello, la disponibilidad de técnicas diagnósticas de gran sensibilidad, sin menospreciar la especificidad, es de vital

importancia ante esta problemática de salud. Para ello, se requiere la aplicación de pruebas sencillas, rápidas y económicas con facilidad de uso para el personal que se desenvuelve en el campo para tomar decisiones rápidas y acertadas, tales como la prueba de aglutinación directa (DAT; *Kit Biomedical Research*) y la prueba inmunocromatográfica rK39 o rK39 dipstick (*Kalazar detect test, Inbios International Inc.*).

Diferentes estudios han validado la utilidad de diferentes pruebas serológicas en el diagnóstico de la leishmaniasis visceral en diferentes países (7-11). Recientemente, hemos evaluado la efectividad de la prueba de aglutinación directa para el diagnóstico de la leishmaniasis visceral en zonas endémicas de nuestro país (12). Por esta razón, nos propusimos comparar la validez de la prueba de aglutinación directa con otras disponibles, la prueba inmunocromatográfica rK39 y la prueba ELISA rK26, tomando como método de referencia la prueba ELISA rK39, cuya utilización es de rutina en Venezuela para la confirmación diagnóstica de la infección (6).

Materiales y métodos

Población bajo estudio

Se evaluaron 50 muestras de suero de pacientes con resultado positivo por ELISA rK39 (infectados por *L. infantum*) y 32 de ellas se revaluaron después de su tratamiento y curación clínica. Todos los pacientes provenían de diferentes zonas endémicas de leishmaniasis visceral en el país: estados de Nueva Esparta (Isla de Margarita), Lara, Anzoátegui y Trujillo.

Los pacientes fueron evaluados y diagnosticados según criterios clínicos, epidemiológicos y serológicos, de acuerdo con los lineamientos de la Organización Panamericana de la Salud (5). Además, se incluyeron 25 muestras de sueros de pacientes con otras enfermedades: leishmaniasis cutánea difusa (n=5), tripanosomiasis americana (n=5), paludismo (n=5), esquistosomiasis (n=5) y lupus eritematoso sistémico (n=5). En las áreas de procedencia de los pacientes incluidos en el estudio, no existen reportes de leishmaniasis atípica debida a infecciones por *L. infantum*.

Correspondencia:

Maira Cabrera, Laboratorio de Inmunoparasitología, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Esquina de San Nicolás a Providencia, San José, apartado postal 4043, Caracas 1010A, Venezuela.

Teléfono: (58212) 862 9604; fax: (58212) 861 1258
mairacab@gmail.com

Recibido: 04/05/09; aceptado:30/07/09

También se estudiaron 17 muestras de sueros de individuos voluntarios sanos residentes de las mismas zonas endémicas de leishmaniasis visceral objeto de este estudio. Estos individuos no tenían historia de haber padecido de ninguna de las formas clínicas de leishmaniasis americana ni de tripanosomiasis americana. Las muestras de suero fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior evaluación.

Prueba de aglutinación directa

Esta prueba se realizó siguiendo instrucciones descritas previamente (13-15). Las muestras de suero se diluyeron en solución salina (NaCl al 0,9%) con β -mercaptoetanol al 0,8%. Se dispusieron en placas de 96 pozos, fondo en "V", y se realizaron diluciones seriadas (desde 1/100 hasta 1/102.400) para cada muestra examinada. El antígeno liofilizado (promastigotes de *L. donovani*, *Kit Biomedical Research*) fue resuspendido en solución salina y agregado a las muestras diluidas hasta una concentración de 5×10^7 parásitos/ml, en un volumen final de 100 μl . Se incubó durante 18 horas a temperatura ambiente para posteriormente realizar la lectura.

Se estableció como punto de corte el máximo valor del título aglutinante de anticuerpos obtenido en las muestras de los individuos controles que, en nuestra evaluación, se determinó en 1/800. Se consideraron como resultados positivos, aquéllos con títulos iguales o superiores al punto de corte. Se estableció una escala de resultados cualitativa, en la cual definimos las siguientes categorías, según el título obtenido: negativo (menor de 1/800), muy débil (1/800), débil (1/800 a 1/3.200), moderado (1/3.200 a 1/25.600), fuerte (1/25.600 a 1/102.400).

Prueba inmunocromatográfica rK39 (rK39 dipstick)

La misma fue ensayada siguiendo las instrucciones del fabricante (*Kalazar DetectTM*, *InBios International*). Cada muestra de suero fue colocada sobre la "tira" de la prueba e incubada con la solución tampón de corrida. La lectura se hizo luego de 10 minutos. Se consideraron como resultados positivos aquéllos que mostraron el patrón de bandas definido por la prueba.

Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) con péptidos recombinantes rK26 y rK39

Las pruebas ELISA fueron realizadas según protocolos descritos previamente (Rodríguez

V, Ulrich M, Centeno M, Zerpa O. Antígenos recombinantes en el diagnóstico de leishmaniasis visceral humana y canina. LII convención ASOVAC. Acta Científica de Venezuela. 2002;53:213; Rodríguez V, Zerpa O, Reed SG, Ulrich M. Caracterización parcial de la reactividad serológica del antígeno rK26 de *Leishmania chagasi*. LIV convención ASOVAC. Acta Científica de Venezuela. 2004;55(Supl.1):210).

Se sensibilizaron placas de poliestireno para microtitulación con 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de péptido recombinante (rK26 o rK39) y se incubaron con las muestras de suero diluidas 1/100. Se utilizó el antisuero polivalente conjugado a peroxidasa (*Sanofi-Pasteur Diagnostics*, Marnes-la-Coquette, France), en una dilución 1/5.000.

La reacción de color se reveló con peróxido de hidrógeno y orto-fenilendiamina. Las densidades ópticas se determinaron a 415 nm en un lector de placas de microtitulación (Biorad, modelo 550 *Microplate Reader*). Se estableció como punto de corte el máximo valor de densidad óptica obtenido en las muestras de los individuos controles, determinado en 0,060.

Se consideraron como pacientes positivos, aquéllos con densidad óptica igual o superior al punto de corte. Se estableció una escala de resultados cualitativa, en la cual definimos las siguientes categorías, según la densidad óptica: negativo (menor de 0,060), muy débil (0,060 a 0,100), débil (0,100 a 0,400), moderado (0,400 a 0,700), fuerte (mayor de 0,700).

Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se construyeron tablas de contingencia de 2 x 2, las cuales se analizaron a fin de establecer los parámetros de validez y seguridad de nuestras pruebas. Dichos parámetros se calcularon aplicando las correcciones para la evaluación de pruebas diagnósticas con patrones de referencia imperfectos (16). Como patrón de referencia, en el estudio se usó la prueba ELISA rK39, cuya especificidad y sensibilidad han sido reportadas alrededor de 97% (17-23). Se determinaron los parámetros de sensibilidad, especificidad, valor diagnóstico positivo y negativo y razón de verosimilitud.

Los intervalos de confianza de cada parámetro se determinaron empleando la aproximación normal de la binomial, excepto para el intervalo de la razón de verosimilitud, para el cual se empleó el método de Taylor (24). Los análisis estadísticos

se realizaron usando los programas informáticos EpiDat v. 3.1 (OPS, Xunta de Galicia, España) y Calculadora Pruebas Diagnósticas v. 1.0.2 (Unidad de Bioestadística Clínica, Hospital Ramón y Cajal, España).

Se hizo, además, un análisis de correspondencia, o correlación, para cada una de las pruebas. Con los valores obtenidos en cada categoría de resultados se realizó una dispersión de puntos (prueba de referencia Vs. prueba evaluada), que se analizó mediante la prueba de correlación no paramétrica de Spearman. El análisis estadístico se realizó usando el programa informático *GraphPad INSTAT-3™* v. 3.02 (*GraphPad Software*, San Diego, CA).

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Biomedicina. Tanto los sujetos sanos como los pacientes y los representantes legales de los pacientes menores de edad, autorizaron el estudio en forma voluntaria y todos firmaron el consentimiento informado.

Resultados

En este estudio evaluamos las pruebas de aglutinación directa, la prueba inmunocromatográfica rK39 y ELISA rK26 en comparación con la prueba de ELISA rK39, como herramientas diagnósticas para la leishmaniasis visceral humana en Venezuela. Los porcentajes de reactividad serológica obtenidos, probando 50 muestras de sueros de pacientes, fueron de 88%, 92% y 36%, respectivamente.

El resultado del análisis de correspondencia evidenció una fuerte correlación ($P < 0,0001$) para todas las pruebas evaluadas al ser comparadas, individualmente, con la prueba de referencia ELISA rK39. La prueba inmunocromatográfica rK39 mostró mayor correlación ($r = 0,91$), que la de aglutinación directa ($r = 0,79$) y la prueba ELISA rK26 ($r = 0,45$).

Los valores de sensibilidad, especificidad, valor diagnóstico positivo y negativo y razón de verosimilitud, obtenidos en las comparaciones, se muestran en el cuadro 1. Todas las pruebas mostraron especificidad y sensibilidad elevadas, excepto la prueba de ELISA rK26 cuya sensibilidad fue muy baja (aproximadamente, 37%), a pesar de poseer buena especificidad.

Además de los parámetros de validez y seguridad de las pruebas evaluadas, se determinaron los porcentajes de reactividad serológica en pacientes ($n = 32$) con leishmaniasis visceral después del tratamiento, con la finalidad de evaluar si las pruebas consideradas podrían discernir entre infección pasada o activa, lo cual sería de mucha utilidad para el clínico. Las pruebas de aglutinación directa e inmunocromatográfica rK39 dieron resultados positivos en un alto porcentaje (96,9%) de los pacientes después del tratamiento. Por el contrario, la prueba ELISA rK26 reaccionó positivamente sólo en 22% de los casos.

Se incluyó un grupo de pacientes con enfermedades asociadas con otras especies de *Leishmania* u otros Trypanosomatidae, y otras cuyos síntomas pudiesen confundirse con leishmaniasis visceral o

Cuadro 1. Sensibilidad, especificidad, valores diagnósticos y razones de verosimilitud de las diferentes pruebas diagnósticas evaluadas.

	Prueba		
	Aglutinación directa	Inmunocromatográfica rK39	ELISA rK26
Sensibilidad (%)	89,74	94,15	36,78
(IC95%)	(81,34 - 98,15)	(87,65 - 100)	(23,41 - 50,15)
Especificidad (%)	89,74	100	98,75
(IC95%)	(79,96 - 99,51)	100	(95,17 - 100)
Valor diagnóstico positivo (%)	92,34	100	97,59
(IC95%)	(84,89 - 99,78)	100	(90,70 - 100)
Valor diagnóstico negativo (%)	86,39	92,81	53,13
(IC95%)	(75,49 - 97,30)	(84,91 - 100)	(41,27 - 64,99)
Razón de verosimilitud	8,74	-	29,42
(IC95%)	(3,79 - 20,17)		(4,05 - 213,48)

Los parámetros de cada prueba fueron obtenidos al compararlas contra ELISA rK39.
IC95%: intervalo de confianza de 95%

en las que se observa hipergammaglobulinemia, todo esto con la finalidad de evaluar la reactividad cruzada que pudiesen tener éstos a las pruebas estudiadas. La prueba ELISA rK26 y la prueba inmunocromatográfica rK39 no presentaron reactividad cruzada evidente, mientras que la aglutinación directa reaccionó inespecíficamente en 9 de las 25 muestras evaluadas (36%), correspondientes a un paciente con malaria, tres con lupus y cinco con leishmaniasis cutánea difusa.

Discusión

En Venezuela, así como en otros países, la leishmaniasis visceral constituye un problema de salud pública que afecta principalmente a niños menores de cuatro años de edad (3,25); la enfermedad puede ser mortal, por lo que el diagnóstico temprano y el tratamiento oportuno son indispensables.

El diagnóstico rutinario de la leishmaniasis visceral incluye la detección de amastigotes por microscopía directa de material aspirado de bazo, médula ósea o ganglios linfáticos, siendo en bazo donde se obtienen los mayores índices de detección de los parásitos. A pesar de ser ésta la técnica de referencia, el procedimiento de obtención de la muestra es complicado y presenta serias implicaciones e inconvenientes para los pacientes, la mayoría de ellos niños con un estado de salud general deplorable, para los cuales significa, incluso, riesgo de muerte por hemorragia (6,26). En este sentido, la Organización Panamericana de la Salud (5), en su definición operativa de caso de leishmaniasis visceral, admite las pruebas serológicas como pruebas confirmatorias alternas a la confirmación parasitológica.

En la leishmaniasis visceral el diagnóstico serológico se ve favorecido por los elevados niveles de anticuerpos característicos de la enfermedad (27), por lo que se han desarrollado diversas pruebas serológicas para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* contra antígenos nativos o péptidos recombinantes. En la actualidad, las pruebas de aglutinación, los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y las pruebas inmunocromatográficas son las más utilizadas (28).

En este estudio evaluamos, comparando con la prueba de ELISA rK39, las pruebas de aglutinación directa, la prueba inmunocromatográfica rK39 y la prueba ELISA rK26, como herramientas diagnósticas para la leishmaniasis visceral humana

en zonas endémicas de Venezuela. Las pruebas de aglutinación directa e inmunocromatográfica rK39 mostraron los mejores resultados en cuanto a sensibilidad, especificidad y valores diagnósticos.

Los elevados valores de sensibilidad y especificidad de la aglutinación directa son coherentes con reportes previos, en los que esta prueba ha demostrado ser una técnica valiosa para los estudios de campo (12,13,29,30). La mayor falta de especificidad de esta prueba se obtuvo con sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa, lo cual ha sido reportado previamente (12). Consideramos que esta reactividad cruzada no afecta la validez de la prueba, pues si tomamos en cuenta que ambas enfermedades son producto de la infección con parásitos del género *Leishmania*, es probable que existan factores determinantes antigénicos comunes que estén generando una respuesta de anticuerpos similar, lo que hace predecible un patrón de reactividad cruzada en ellas. Sin embargo, las características clínicas de ambas enfermedades son suficientemente disímiles entre sí, por lo cual no se debe generar confusión diagnóstica.

Es importante también hacer notar que en la prueba de aglutinación se emplean parásitos completos como antígenos, a diferencia de las pruebas ELISA y de la prueba inmunocromatográfica rK39, en las que se usa un péptido particular. En el caso de la prueba de aglutinación, esto indudablemente aumenta las probabilidades de reacciones cruzadas, principalmente con enfermedades con hipergammaglobulinemias inespecíficas, como lupus eritematoso sistémico u otras enfermedades.

Al evaluar la prueba inmunocromatográfica rK39 obtuvimos altos valores de sensibilidad y especificidad, una fuerte correlación con el patrón de referencia y ausencia de reactividad cruzada con otras enfermedades. Los resultados confirman reportes previos sobre la eficacia diagnóstica de la prueba. En Brasil, en el año 2003 (31), reportaron 89% y 98% de sensibilidad y especificidad, respectivamente. En India se han reportado valores más elevados, 100% de sensibilidad y 98% de especificidad (32,33). En el año 2006, Chappuis *et al.* (29) realizaron un metanálisis de 13 estudios, y determinaron los valores de sensibilidad y especificidad alrededor de 94% y 90%, respectivamente.

En este estudio evaluamos también la técnica ELISA empleando el antígeno recombinante K26,

un antígeno hidrofílico aislado de *L. infantum* (34), el cual resultó altamente específico, aunque su sensibilidad fue muy baja. La prueba permitió el reconocimiento de pacientes después del tratamiento en un porcentaje bajo de casos, a diferencia de la aglutinación directa y de la prueba inmunocromatográfica rK39, cuyos porcentajes de reactividad fueron altos.

Esto confirma los hallazgos previos que indican que los anticuerpos que se generan contra el antígeno recombinante K26 no perduran luego del tratamiento (Rodríguez V, Zerpa O, Reed SG, Ulrich M. Caracterización parcial de la reactividad serológica del antígeno rK26 de *Leishmania chagasi*. LIV convención ASOVAC. Acta Científica de Venezuela. 2004;55(Suppl.1):210).

Los estudios realizados con pruebas serológicas que emplean el antígeno recombinante K26 en humanos son escasos, pero sus resultados concuerdan con los nuestros. En Brasil se evaluó una prueba inmunocromatográfica (35) y se obtuvo, al igual que en nuestro estudio, una elevada especificidad acompañada por una baja sensibilidad. Además, en un estudio reciente (36), se evaluó un ELISA rK26 en pacientes con leishmaniasis visceral después del tratamiento, y también reportaron una sensibilidad considerablemente baja (alrededor de 48%).

En general, este estudio arroja resultados valiosos en relación con el diagnóstico de leishmaniasis visceral con las pruebas de aglutinación directa y la prueba inmunocromatográfica rK39. Sin embargo, sería conveniente ampliar el estudio a un número mayor de individuos e incluir sujetos asintomáticos y pacientes coinfectados con *L. infantum* y VIH.

Nuestros resultados indican que, tanto la pruebas de aglutinación directa como la prueba inmunocromatográfica rK39, pueden constituirse como herramientas diagnósticas de primera mano alternativas a ELISA rK39, la cual, aunque actualmente es la técnica de referencia en nuestro país, es de más difícil aplicación en el campo que las anteriores.

La selección de una técnica u otra debe hacerse evaluando exhaustivamente la relación costo-beneficio para cada área endémica de leishmaniasis visceral en particular. Es importante tener en cuenta el número de muestras por evaluar. Para un análisis a gran escala, indudablemente, la prueba ELISA sería la elección más sensata. No obstante, el desarrollo de pruebas de aglutinación

con antígenos locales conllevaría, entre otros beneficios, al abaratamiento de los costos, lo que permitiría también la utilización de dicha prueba en estudios masivos. En los casos de estudios puntuales, con pocas muestras, la prueba inmunocromatográfica rK39 constituye la mejor opción. Debe considerarse también la urgencia del diagnóstico y el tipo de situación para la que se realiza la prueba: diagnóstico temprano, descarte, tamización para estudios epidemiológicos, seguimiento de los pacientes, etc. En situaciones en las que se requiera un diagnóstico urgente, la prueba inmunocromatográfica rK39 es la más indicada; de lo contrario, las pruebas de aglutinación directa y ELISA son las mejores alternativas.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan la inexistencia de conflictos de interés.

Financiación

Esta investigación fue financiada en parte por el FONACIT, proyecto grupal número G2005000375.

Referencias

1. Kafetzis DA, Maltezou HC. Visceral leishmaniasis in pediatrics. *Curr Opin Infect Dis*. 2002;15:289-94.
2. Palatnik-de-Sousa CB, dos Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Reis AB, Palatnik M, et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:510-7.
3. Zerpa O, Ulrich M, Borges R, Rodríguez V, Centeno M, Negron E, et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev Panam Salud Pública*. 2003;13:239-45.
4. WHO. Zoonoses and veterinary public health: Leishmaniasis [online]. Fecha de consulta: 15 de agosto de 2007]. Disponible en: <http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en/>.
5. OPS. Definiciones de caso: leishmaniasis visceral. *Boletín Epidemiológico*. 2002;23:14.
6. Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:951-8.
7. Andrade CR, Nascimento AE, Moura PM, Andrade PP. *Leishmania donovani donovani* and *Leishmania donovani chagasi* as antigens in a direct agglutination assay for the diagnosis of kala-azar. *Braz J Med Biol Res*. 1989;22:611-5.
8. De Assis TS, Braga AS, Pedras MJ, Barral AM, Siquera IC, Costa CHN, et al. Validation of the rapid immunochromatographic test IT-LEISH® for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. *Epidemiol Serv Saude*. 2008;17:112-6.
9. Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Pérez A, Arias J. Value of a dipstick based on recombinant

- rK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite*. 2001;8:355-7.
10. Garcez LM, Shaw JJ, Silveira FT. Direct agglutination tests in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in the state of Para. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996;29:165-80.
 11. Pedras MJ, de Gouvêa Viana L, de Oliveira EJ, Rabello A. Comparative evaluation of direct agglutination test rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:172-8.
 12. Terán-Angel G, Schallig HD, Zerpa O, Rodríguez V, Ulrich M, Cabrera M. The direct agglutination test as an alternative method for the diagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Biomédica*. 2007;27:447-53.
 13. El Harith A, Kolk AH, Leeuwenburg J, Muigai R, Huigen E, Jelsma T, *et al*. Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 1988;26:1321-5.
 14. Meredith SE, Kroon NC, Sondorp E, Seaman J, Goris MG, van Ingen CW, *et al*. Leish-KIT, a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1742-5.
 15. Oskam L, Nieuwenhuijs JL, Hailu A. Evaluation of the direct agglutination test (DAT) using freeze-dried antigen for the detection of anti-Leishmania antibodies in stored sera from various patient groups in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999;93:275-7.
 16. Valenstein PN. Evaluating diagnostic tests with imperfect standards. *Am J Clin Pathol*. 1990;93:252-8.
 17. Burns JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:775-9.
 18. Salotra P, Sreenivas G, Beena KR, Mukherjee A, Ramesh V. Parasite detection in patients with post kala-azar dermal leishmaniasis in India: a comparison between molecular and immunological methods. *J Clin Pathol*. 2003;56:840-3.
 19. Singh S, Kumari V, Singh N. Predicting kala-azar disease manifestations in asymptomatic patients with latent *Leishmania donovani* infection by detection of antibody against recombinant K39 antigen. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:568-72.
 20. Sreenivas G, Ansari NA, Singh R, Subba BV, Bhatheja R, Negi NS, *et al*. Diagnosis of visceral leishmaniasis: comparative potential of amastigote antigen, recombinant antigen and PCR. *Br J Biomed Sci*. 2002;59:218-22.
 21. Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N, Alkan MZ, Gul K, Gilman-Sachs A, *et al*. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:363-9.
 22. Qu JQ, Zhong L, Masoom-Yasinzai M, Abdur-Rab M, Aksu HS, Reed SG, *et al*. Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with a recombinant antigen from the repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994;8:543-5.
 23. Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EA, El-Hassan AM, Reed SG, *et al*. rK39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998;5:717-20.
 24. Altman DG. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman & Hall Press; 1991. p. 611.
 25. Murray HW. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:787-94.
 26. Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1983;32:475-9.
 27. Hailu A, Musa AM, Royce C, Wasunna M. Visceral leishmaniasis: new health tools are needed. *PLoS Med*. 2005;2:e211.
 28. Singh RK, Pandey HP, Sundar S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *Indian J Med Res*. 2006;123:331-44.
 29. Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J, Boelaert M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 Kalazar detect test for visceral leishmaniasis. *BMJ*. 2006;333:723.
 30. Joshi AB, Singhasivanon P, Khusmith S, Fungladda W, Nandy A. Evaluation of direct agglutination test (DAT) as an immunodiagnostic tool for diagnosis of visceral leishmaniasis in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999;30:583-5.
 31. Carvalho SF, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:321-4.
 32. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet*. 1998;351:563-5.
 33. Goswami RP, Bairagi B, Kundu PK. K39 strip test-easy, reliable and cost-effective field diagnosis for visceral leishmaniasis in India. *J Assoc Physicians India*. 2003;51:759-61.
 34. Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaro R, Reed SG, Skeiky YA. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;102:249-61.
 35. Da Costa RT, Franca JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O, Campos-Neto A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2003;97:678-82.
 36. De Almeida L, Romero HD, Prata A, Costa RT, Nascimento E, Carvalho SF, *et al*. Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:739-43.