

Desenvolvimento de um método diagnóstico para a leishmaniose tegumentar americana com base em Western blot de frações antigênicas de *Leishmania braziliensis*

As leishmanioses compreendem um espectro de doenças distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, cujas manifestações clínicas variam desde lesões cutâneas que tendem para autocura até graves lesões mucocutâneas mutilantes ou infecções viscerais. É um problema de Saúde Pública importante, haja vista que afeta cerca de 12 milhões de pessoas que vivem em zonas endêmicas. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) incide em todas as regiões do Estado de Pernambuco, com focos epidêmicos em micro regiões do Agreste, na Zona da Mata e nos municípios situados em regiões de serras e vales. Com a intenção de desenvolver e aprimorar um teste imunodiagnóstico baseado em Western blot nós identificamos antígenos relevantes de *Leishmania braziliensis* para o diagnóstico de LTA, e comparamos a sensibilidade e especificidade obtidas, com aquelas provenientes da utilização de imunofluorescência indireta (IFI) e "enzyme linked immunosorbent assay" (ELISA). Foram estudados os seguintes grupos de indivíduos: 58 pacientes com leishmaniose tegumentar ativa; 25 pacientes curados através de quimioterapia específica e 10 pacientes curados espontaneamente; 10 indivíduos normais residindo em área endêmica e 8 indivíduos normais não residentes em área endêmica; 30 pacientes com outras doenças infecciosas e parasitárias. Esses indivíduos foram selecionados para o estudo com a ajuda do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Para a IFI, a sensibilidade obtida foi de 51,7% e a especificidade de 78,6%, enquanto que com o teste de ELISA, utilizando antígenos solúveis, a sensibilidade foi de 62,1% e a especificidade de 71,4%. Quando as sensibilidades e especificidades obtidas utilizando IFI e ELISA foram comparadas, não houve diferença

Developing of a test for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis based on Western blot of antigenic fractions of *Leishmania braziliensis*

Leishmaniasis comprises a spectrum of different diseases found all over the world, in tropical and subtropical regions. The severity of disease varies from benign self-healing cutaneous lesions until severe mutilating mucocutaneous lesions or visceral infections. It constitutes a significant public health problem affecting approximately 12 million people living in endemic areas. The American cutaneous leishmaniasis (ACL) is present in the State of Pernambuco, Brazil, being epidemic in micro regions of Agreste, Zona da Mata and in municipalities located in valleys and hills. Relevant antigens of *Leishmania braziliensis* were identified in order to develop and optimize a Western blot based immunodiagnostic test for ACL. The resulting sensitivity and specificity were compared with those resulting from indirect immunofluorescence (IIF) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The following groups were studied: 58 patients with active ACL; 25 patients cured with specific chemotherapy and 10 self-healed patients; 10 normal endemic individuals and 8 normal individuals living in non endemic areas; 30 patients with other infectious diseases. These groups were selected with the collaboration of the Department of Dermatology, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco. The sensitivity for IIF was 51.7 %, while the specificity was 78.6%. Performing ELISA, the sensitivity was 62.1 % and the specificity 71.4 %. When the sensitivities and specificities of IIF and ELISA were compared there was no significant statistical difference ($p = 0.2606$ and $p = 0.5371$, respectively). For the Western blot described in the present thesis, the sensitivity was 90.9 % while the specificity was 100 %. The Western blot assay was both more sensitive ($p < 0.01$) and specific ($p < 0.01$) than IIF and ELISA. Two factors contributed for the success in obtaining a simple and reproducible diagnostic

significativa ($p = 0,2606$ e $p = 0,5371$, respectivamente). Com a aplicação dos critérios que estabelecemos para o imunodiagnóstico por Western blot, obteve-se uma sensibilidade de 90,9% e uma especificidade de 100%. O teste de Western blot que estamos propondo foi bem superior à IFI em termos de sensibilidade ($p = 0,0001$) e especificidade ($p = 0,0095$). Também foi superior ao teste de ELISA em relação à sensibilidade ($p = 0,0030$) e à especificidade ($p = 0,0023$). Dois fatores contribuíram para que pudéssemos obter um perfil de reconhecimento antigênico por Western blot simples e reproduzível o suficiente para poder ser proposto para o imunodiagnóstico. Em primeiro lugar, as características da resposta imune na leishmaniose tegumentar, em que a resposta anticórpica não é intensa e poucos antígenos são reconhecidos. Em segundo lugar, a utilização de frações antigênicas citoplasmáticas e membranosas do parasita diminuiu a complexidade antigênica. Finalmente, o Western blot descrito na presente tese, foi otimizado de forma a reduzir tanto quanto possível o reconhecimento inespecífico de bandas antigênicas. Estamos propondo os seguintes critérios para o imunodiagnóstico da LTA por Western blot: i) a presença do antígeno solúvel de 27kDa isoladamente ou em combinação com outras bandas; ii) a presença do antígeno solúvel de 30kDa isoladamente ou em combinação com outras bandas; iii) a presença dos antígenos de 66kDa (solúvel) e 48, 19 e 16kDa (insolúveis) reforçam o diagnóstico mas não são suficientes para o mesmo. Quando se comparou os grupos com LTA ativa e os mesmos indivíduos após tratamento específico, notou-se claramente uma diminuição na reatividade anticórpica nos testes de IFI, ELISA e Western blot. Resultados semelhantes ocorreram nos casos de cura espontânea.

profile using Western blot. Firstly, the typically weak antibody response in ACL, limiting the number of antigens recognized. Secondly, the employment of fractions of the parasite (cytoplasmatic and membraneus fractions) diminished the complexity of the antigenic preparation. Finally, the Western blot described herein was optimized in order to decrease the non specific recongnition of antigens. We are proposing the following criteria for the immunodiagnosis of ACL by Western blot: i) the recognition of the 27kDa soluble antigen alone or in combination with other antigens; ii) the recognition of the soluble 30kDa antigen alone or in combination witer other bands; iii) the presence of the 66kDa antigen and the insoluble 48, 19 and 16kDa antigens support the diagnosis but are not sufficient. After treatment or self-healing of the cutaneous leishmaniasis there was a clear reduction of antibody reactivity evaluated by IIF, ELISA and Western blot.

Maria Edileuza Felinto de Brito

Tese apresentada ao Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Pernambuco para
obtenção do Título de Mestre.

Recife, PE, Brasil, 1998