

## Artículo Original

# Análisis de inmunoblot de antígenos de *Leishmania infantum* y *Leishmania donovani* en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral de Venezuela.

*Immunoblot analysis of Leishmania infantum and Leishmania donovani antigens in sera of patients with visceral leishmaniasis in Venezuela.*

Carrillo-Rosario Teolinda<sup>1</sup>, Moreno Glenda<sup>1</sup>, Márquez Jairo<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Ecología y Epidemiología de Leishmaniasis Visceral (LIELV), Departamento de Biología y Química; <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Económicas y Contables; Núcleo Universitario "Rafael Rangel", Trujillo. Universidad de Los Andes, República Bolivariana de Venezuela.

Recibido junio 2012 - Aceptado octubre 2012

## RESUMEN

Mediante análisis de inmunoblot se estudió la especificidad de la respuesta inmune humoral en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral de Venezuela, procedentes de los estados Anzoátegui, Carabobo, Lara, Nueva Esparta, Sucre y Trujillo, diagnosticados clínica, parasitológica y/o serológicamente, frente a polipéptidos de promastigotos de dos cepas de *Leishmania infantum*, una autóctona del estado Trujillo, y la otra de referencia del Mediterráneo y una de *L. donovani* de referencia de la India. Sueros controles de personas sanas, de pacientes con otras formas clínicas de leishmaniasis, enfermedad de Chagas y tuberculosis fueron incluidos. El análisis de los blots reveló que los polipéptidos antigénicos de 94 KDa (100%), 83 KDa (58%) y 70 KDa (79%) sólo fueron reconocidos por anticuerpos de los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral, mientras que los de 77, 53-55, 50-52, 32, 18-19 y 16-17 KDa son de reactividad cruzada al ser reconocidos por anticuerpos de los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, leishmaniasis tegumentaria, cutánea difusa y tuberculosis. El análisis de varianza reveló que no existen diferencias significativas en la proporción de reconocimiento de polipéptidos en los tres extractos leishmánicos por anticuerpos de los diferentes sueros estudiados, sugiriendo que el extracto de promastigotos de *L. infantum* de Trujillo, puede ser utilizado como antígeno en inmunoblot. El análisis factorial de correspondencias múltiples (AFCM) formó siete grupos de variables, siendo

el único de interés, la enfermedad leishmaniasis visceral (VIS) en el cual hacen correspondencias múltiples las variables: VIS y las bandas antigénicas de 94 KDa, 70 KDa y 83 KDa.

## PALABRAS CLAVE

Inmunoblot, Leishmaniasis visceral humana, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, Venezuela.

## ABSTRACT

By means of immunoblot analysis the specificity of the humoral immune response in serum of patients with visceral leishmaniasis in Venezuela was studied, using samples collected from Anzoátegui, Carabobo, Lara, Nueva Esparta, Sucre, and Trujillo states; these samples were clinical, parasitological and serological identified and proved against promastigotes polypeptides of two *Leishmania infantum* strains obtained from Trujillo state and the Mediterranean area; in case of *L. donovani* strains, these were obtained from India. Control serum of healthy individuals as well as of patients with other clinical forms of leishmaniasis, Chagas disease and tuberculosis were also included. Blots analysis showed that polypeptides antigens of 94 KDa (100%), 83 KDa (58%) and 70 KDa (79%) were only recognized by the sera antibodies from patients with visceral leishmaniasis, while 77, 53-55, 50-52, 32, 18-19 and 16-17 KDa revealed crossed linked reactions when these are recognized by the sera antibodies from patients coursing diseases such as

Chagas, cutaneous leishmaniasis, diffuse cutaneous and tuberculosis. The variance analysis revealed that no significant differences may be observed in the recognition of polypeptides in the three different sera leishmanial antibody extracts, suggesting that promastigotes of *L. infantum* from Trujillo-Venezuela extract could be used in immunoblotting as an antigen. The multiple correspondence factor analysis (AFCM) formed seven groups of variables, being the visceral leishmaniasis disease (VIS) the only group of interest in which multiple variables might be involved: VIS and antigenic bands of 94 KDa, 70 KDa and 83 KDa.

## KEY WORDS

Immunoblot, Human visceral leishmaniasis, *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*, Venezuela.

## INTRODUCCIÓN

*Leishmania donovani* Ross, 1903 y *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 son los agentes etiológicos de la leishmaniasis visceral humana [1, 2, 3]. La OMS [4], al señalar que la parasitosis es endémica en 88 países del mundo, reporta 14 millones de personas infectadas, estimando 350 millones a riesgo de contraer la enfermedad, registrando 500.000 nuevos casos por año. De este total el 90% lo suman Bangladesh, India, Nepal, Sudán y Brasil. En Venezuela, la leishmaniasis visceral se distribuye en el territorio norte, siendo los estados más afectados Nueva Esparta, Anzoátegui, Lara, Aragua y Sucre seguida por los estados Carabobo, Guárico, Trujillo, Falcón y Cojedes, con una incidencia anual que oscila entre 7,2 y 0,4 por 100.000 habitantes [5, 6, 7, 8, 9].

El cuadro visceral se presenta con un espectro clínico que va desde la condición asintomática, pasando por la subclínica hasta objetivarse en el cuadro agudo clásico, con sus rasgos cardinales: fiebre intermitente, palidez cutáneo-mucosa, emaciación, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergammaglobulinemia e hipoalbuminemia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatías y puede complicarse con manifestaciones infecciosas y hemorrágicas [5, 7, 10, 11,12, 13, 14,15]. La mortalidad es muy alta en los casos no tratados (90% - 100%) y aún con tratamiento puede alcanzar tasas de 5% a 30% [11, 16].

El diagnóstico clínico es complejo ya que el cuadro nosológico produce un espectro de posibles diagnósticos diferenciales de patologías que

coexisten en las mismas áreas geográficas, como lo son la malaria, fiebre tifoidea, tuberculosis, algunas leucemias y la enfermedad de Chagas [5, 10, 12, 14]. Tradicionalmente, el diagnóstico definitivo lo constituye el parasitológico, por la demostración del parásito en muestras de tejidos, siendo el método de elección el aspirado de médula ósea, seguido de punción ganglionar, biopsia hepática y aspirado esplénico. No obstante, estas prácticas clínicas invasivas, de gran riesgo en pacientes en la fase aguda, a veces no son exitosas, ya que los parásitos pueden estar presentes en escaso número a pesar de la severidad de la sintomatología clínica [12].

El diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos anti-leishmania circulantes ha sido la alternativa más útil, para confirmar el diagnóstico clínico, sin embargo, se han reportado reacciones inespecíficas. Modificaciones a las pruebas serológicas han sido propuestas para disminuir el problema de la reactividad serológica cruzada en el diagnóstico diferencial de leishmaniasis visceral. En este contexto, varias proteínas específicas de *Leishmania* incluyendo de *L. infantum* y de *L. donovani* han sido identificadas por inmunoprecipitación y por electroforesis en geles de poliacrilamida en sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE), mediante la técnica de inmunoblot. Técnica utilizada para el diagnóstico y propósitos epidemiológicos cuando antígenos inmunodominantes han sido propuestos para el diagnóstico de infecciones asintomáticas y sintomáticas [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26].

El propósito del presente estudio fue investigar mediante Inmunoblot la respuesta inmune humoral en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral activa diagnosticada clínica, parasitológica y/o serológicamente frente a polipéptidos separados en SDS-PAGE de promastigotos de dos cepas de *L. infantum*, una del estado Trujillo, Venezuela y la otra de referencia del Mediterráneo y una cepa de *L. donovani* de referencia de la India, a fin de examinar si el patrón de reactividad antígeno-anticuerpo es similar para los tres extractos leishmanicos y comparar ese patrón de respuesta con sueros de otras patologías que coexisten en áreas endémicas del país, para así identificar antígenos relevantes que sirvan para el diagnóstico y propósitos epidemiológicos de leishmaniasis visceral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Antígenos

*L. infantum* (MHOM/TN/80/IPT-1) zimodemo

1 (MON-1), *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD-8) zimodemo 2 (MON-2), cepas de referencia OMS y *L. infantum* (MHOM/VE/87/TRU-3) zimodemo 1 (MON-1) del estado Trujillo, Venezuela [2, 27].

#### **Preparación de Antígenos de *L. infantum* y de *L. donovani*.**

Promastigotos de *L. infantum* y *L. donovani* fueron obtenidos por cultivo en masa en medio NNN, cosechados en la fase estacionaria. Siguiendo la técnica de Towbin y col. [28], los promastigotos lavados en PBS 0,02 M pH 7,2, fueron lisados en Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, Sodio Dodecil Sulfato (SDS) 2%, Glicerol 10% y 2-Mercaptoetanol 2%. Los sobrenadantes, se conservaron como extracto antigénico. La concentración de proteínas se determinó según el método de Lowry [29]. Los extractos antigénicos se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **Sueros.**

Se evaluaron 19 muestras de sueros de casos clínicos activos de leishmaniasis visceral procedentes de varias áreas endémicas del país: estados de Carabobo (n=6), Nueva Esparta (n=3), Sucre (n=2), Anzoátegui (n=4), Lara (n=2) y dos (n=2) sueros de casos infantiles del estado Trujillo, todos con diagnóstico clínico, parasitológico y/o serológico (ELISA/promastigotos de *L. infantum* estandarizado). Asimismo, se incluyeron 26 muestras de sueros de pacientes con otras patologías: 14 de diversas formas clínicas de Leishmaniasis tegumentaria, uno de leishmaniasis cutánea mucosa (LCM) del estado Miranda (n=1), cinco de leishmaniasis cutánea difusa (LCD) procedentes de los estados Apure (n=2), Anzoátegui (n=2) y Cojedes (n=1), y ocho de leishmaniasis cutánea localizada (LCL) de los estados Sucre (n=2), Miranda (n=1) y Trujillo (n=5); nueve de enfermedad de Chagas y tres de tuberculosis del estado Trujillo. Además se emplearon cinco sueros controles negativos de donadores sanos sin historia clínica ni evidencia serológica de leishmaniasis, tripanosomiasis u otras hemoparasitosis, ni evidencia serológica de enfermedades bacteriales y virales, donados por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Todos los sueros fueron guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El estudio fue realizado siguiendo los lineamientos establecidos en la Declaración de Helsinki para investigación en humanos reseñados en el Código de Bioética y Bioseguridad del FONACIT [30].

#### **Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Sodio Dodecil Sulfato (SDS-PAGE).**

Geles de poliacrilamida en SDS fueron

preparados de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli [31]. El gel de corrida al 12% de SDS y el gel espaciador al 4 % de SDS. En el gel espaciador se dispuso por duplicado en tres pozos sucesivos 30  $\mu\text{g}$  de cada extracto antigénico (*L. infantum* Venezuela; *L. infantum* Mediterráneo y *L. donovani* India) resuspendidos en buffer de lisis adicionado de azul de bromofenol 0,3%. En el pozo central, se dispuso una mezcla de estándares preteñidos de proteínas de bajo peso molecular (BIO-RAD). La corrida electroforética se realizó en cámara Mini-PROTEAN II (BIO-RAD), con buffer de corrida, Tris Base 25 mM, Glicina 192 mM y SDS al 10% pH 8,4, a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos 150 voltios.

#### **Inmunoblot.**

La electrotransferencia de los polipéptidos desde geles de SDS-poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa (0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro) se realizó en cámara de transblotting (BIO-RAD), siguiendo la metodología de Towbin y col. [28] modificada por Bittner y col. [32]. Finalizada la electrotransferencia, las membranas se secaron sobre papel filtro y se cortaron en tiras de 2,5 cm de ancho y luego fueron bloqueadas en Albúmina Sérica Bovina (BSA) 5% en Buffer Fosfato Salino (PBS) 0,15 M pH 7,2-Tween-20, 0,1% [33]. Seguidamente, las tiras fueron incubadas con suero diluido 1:200 en buffer BSA-PBS-Tween-20.

Después de la incubación con el conjugado anti-IgG humana-peroxidasa (Sigma) diluido 1:2.000, las membranas fueron lavadas con NaCl-T (NaCl 150 mM y 0,2% Tween-20) y los anticuerpos revelados por adición de diaminobencidina +  $\text{COCl}_2$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  en PBS. La determinación de los pesos moleculares, movilidades relativas y densidad, se realizó en Densitómetro GelDoc 2000 (BIO-RAD), empleando el programa Quantity One (BIO-RAD).

#### **Análisis de Varianza y Análisis Factorial de Correspondencias Múltiples (AFCM).**

Para determinar si el patrón de respuesta de anticuerpos de cada grupo sérico es similar frente a cada uno de los tres antígenos leishmánicos, se aplicó un análisis de varianza para un solo factor (Antígeno) con tres niveles del factor (A1=*L. infantum*, Trujillo, Venezuela; A2=*L. infantum*, Túnez, Mediterráneo, OMS; A3=*L. donovani*, India, OMS), con una variable de respuesta, proporción de reconocimiento de las bandas antigénicas por las inmunoglobulinas. Antes de aplicar el análisis de varianza, se procedió a verificar el supuesto de normalidad mediante el estadístico de Prueba de Kolmogorov-Smirnov y el supuesto de igualdad de varianza mediante el estadístico de Prueba de Levene, para decidir si es

pertinente la aplicación del análisis de varianza para el modelo lineal completamente aleatorizado [34]. Para este análisis se utilizó el software SPSS versión 15.0.

Con los resultados obtenidos del análisis de varianza, se procedió a realizar el AFCM, para estudiar las relaciones simultáneas entre las variables: bandas antigénicas, proporción de reconocimiento por inmunoglobulinas, enfermedad, diagnóstico parasitológico y diagnóstico serológico, en la muestra de 45 sueros. Muestra donde se estudiaron todas estas variables y a las cuales corresponde solamente una alternativa de respuesta [35, 36]. A partir de un cuadro de contingencia de naturaleza categórica transformada a escala, el AFCM objetiva la búsqueda directa de la mejor representación simultánea de dos conjuntos sobre un mismo gráfico de contingencias de múltiples variables activas, para la formación de los ejes factoriales. Uno constituido por las filas (sueros estudiados) y el otro por las columnas (variables activas). El objetivo de este análisis es el de visualizar lo esencial de la información inicial haciendo las transformaciones correspondientes para redefinir la dimensionalidad de los datos, extrayendo aquellas variables de mayor peso

explicativo. De esta forma, el análisis permite evidenciar relaciones entre variables al eliminar la redundancia de la información. Este análisis se aplicó por dos razones: 1- es una técnica que no exige un supuesto sobre la naturaleza de las variables y 2- porque se adapta a la naturaleza de cada variable (de escala nominal y ordinal) incluida en el estudio. Para procesar los resultados del AFCM se utilizó el software SPAD versión 4.5.

## RESULTADOS

Los 19 sueros de pacientes con leishmaniasis visceral reconocieron polipéptidos en un rango de masas moleculares relativas entre 16-17KDa a 119 KDa, siendo la banda de 94 KDa reconocida por todos los sueros, seguida por la de 70 KDa (79%) y la de 83 KDa (58%), en los tres extractos leishmánicos, incluyendo el suero de un caso autóctono infantil del estado Trujillo (MHOM/VE/87/TRU-3), suero utilizado de referencia positiva para todos los ensayos de inmunoblot. Aunque no se detectó variación en el patrón de respuesta individual frente a uno u otro extracto leishmánico, sí se observó entre sueros (Figura 1).

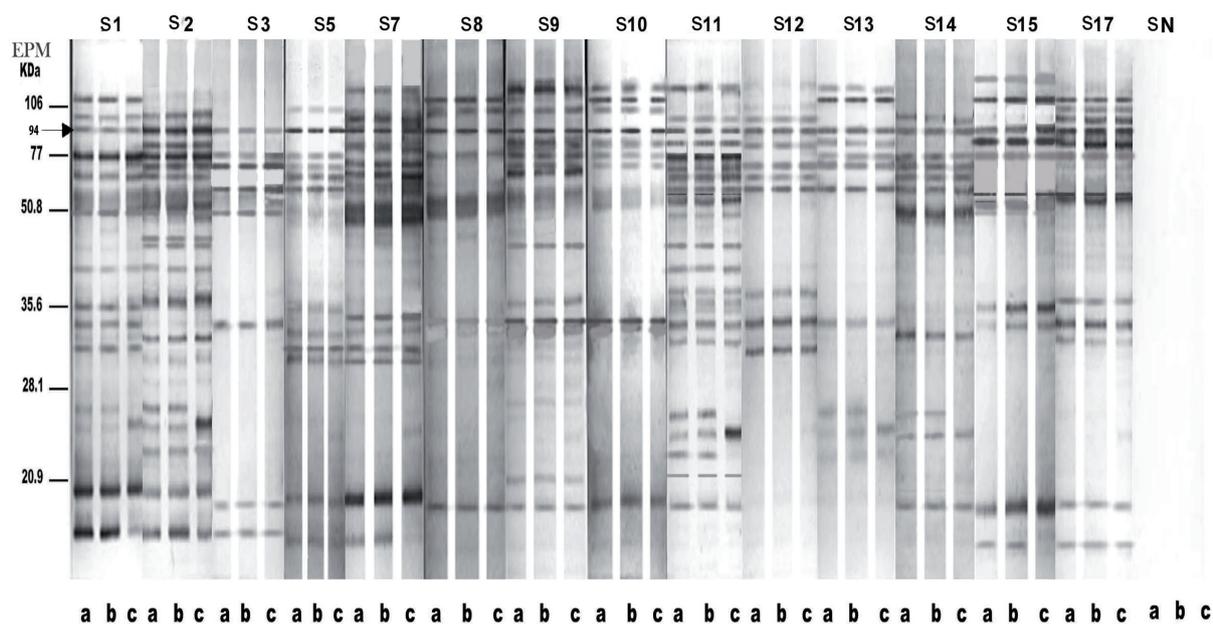


Figura 1. Inmunoblot del patrón de polipéptidos de extractos crudos de promastigotos de (a) *Leishmania infantum* Trujillo, Venezuela (MHOM/VE/87/TRU-3) (b) *L. infantum*, OMS, del Mediterráneo (MHOM/TN/80/IPT-1) y (c) *L. donovani*, OMS, de la India (MHOM/IN/80/DD-8), reconocidos por anticuerpos presentes en sueros de pacientes (S) con leishmaniasis visceral activa. (N) pool de sueros negativos. Sueros a dilución 1:200 y conjugado anti-IgG-humana peroxidasa (Amersham) a dilución 1:2000. EPM: estándares de proteínas de bajo peso molecular (Kilodalton).

Los 14 sueros de pacientes con otras formas clínicas de leishmaniasis, reconocieron entre 3 y 10 bandas antigénicas, siendo la región de 50-55 KDa y la banda de 77 KDa, reconocidas por el 100% de los sueros, bandas de reactividad cruzada. El único suero de LCM reconoció además la banda de 80 KDa.

En los nueve sueros de pacientes con enfermedad de Chagas crónica también se detectó una extensa reactividad serológica cruzada con los sueros de leishmaniasis visceral. Sólo una banda, la de 106 KDa, no fue reconocida. Resultados que confirman una vez más la similitud antigénica entre especies de los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* de la familia Trypanosomatidae. Similarmente, los tres

sueros de pacientes con tuberculosis, también exhibieron reactividad cruzada con los sueros de leishmaniasis visceral, incluyendo las bandas de 80 KDa de LCM y 106 KDa de enfermedad de Chagas. Estos resultados sugieren igualmente cierta similitud antigénica entre *Mycobacterium* y kinetoplastida. Finalmente, el pool de sueros negativos de donadores sanos no reconoció ninguna fracción antigénica en los tres extractos leishmánicos.

A pesar de esta extensa reactividad cruzada, la región polipeptídica entre 83-102 KDa es reconocida sólo por los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral. Resaltando la banda de 94 KDa reconocida por el 100% de estos sueros (Figura 2).

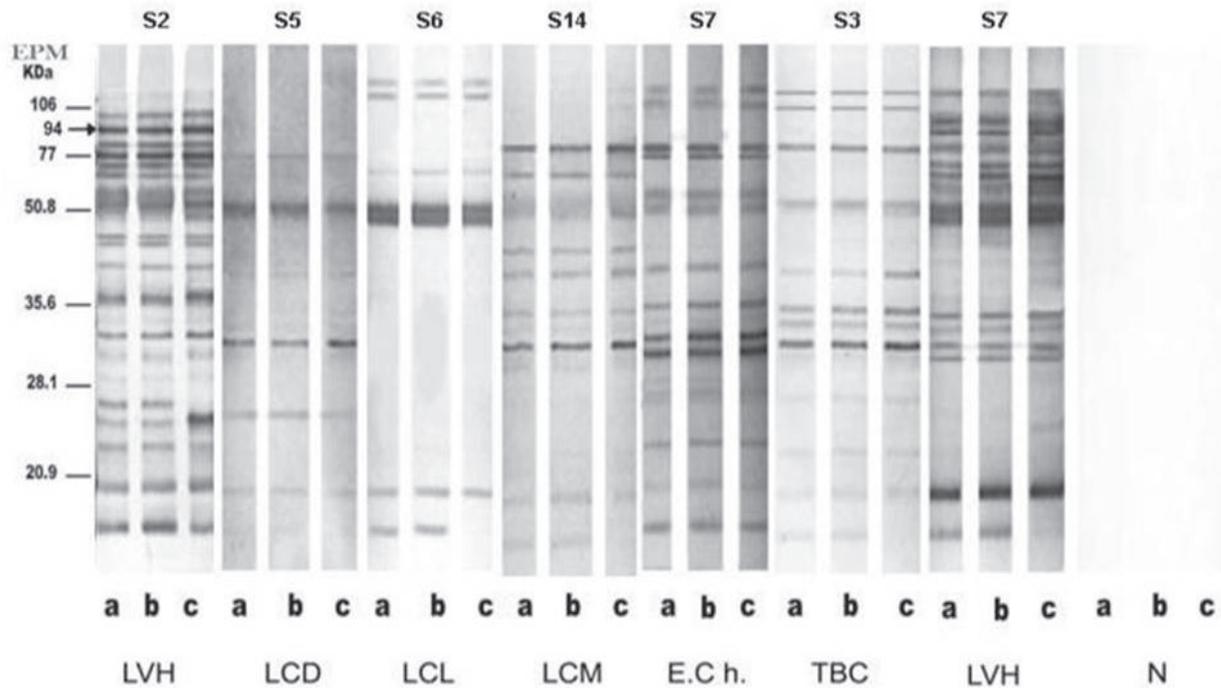


Figura 2. Inmunoblot del patrón de polipéptidos de extractos crudos de promastigotos de (a) *Leishmania infantum* de Trujillo, Venezuela (MHOM/VE/87/TRU-3) (b) *L. infantum*, OMS, del Mediterráneo (MHOM/TN/80/IPT-1) y (c) *L. donovani*, OMS, de la India (MHOM/IN/80/DD-8), reconocidos por anticuerpos presentes en sueros de pacientes (S) con: leishmaniasis visceral humana (LVH), leishmaniasis cutánea difusa (LCD), leishmaniasis cutánea localizada (LCL), leishmaniasis cutánea mucosa (LCM), enfermedad de Chagas (ECh), tuberculosis (TBC) y (N) pool de sueros negativos. Sueros a dilución 1:200 y conjugado anti-IgG-humana peroxidasa (Amersham) a dilución 1:2000. EPM: estándares de proteínas de bajo peso molecular (Kilodalton).

Para el análisis de varianza de los resultados obtenidos se realizó previamente la comprobación de los supuestos de normalidad y de igualdad de varianza; en cuanto al primer supuesto se determinó que el estadístico de Prueba de Kolmogorov-Smirnov, rechazó la hipótesis nula para cualquier nivel de significación (Tabla 1). A pesar de que no se cumplió, esto no afectó la validez del análisis de

varianza puesto que este es un método estadístico bastante robusto, en el sentido de que el estadístico de prueba F no se ve fuertemente influenciado por valores contaminados, mientras que el estadístico de Prueba de Levene, no rechazó la hipótesis nula del supuesto de igualdad de varianza para un valor del estadístico de prueba de 0,044 con un  $\alpha=0,01$  menor que  $p=0,957$  (Tabla 1).



## DISCUSIÓN

El análisis de los blots demostró que las inmunoglobulinas G (IgG) de los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral reaccionaron variablemente con la mayoría de polipéptidos presentes en los extractos de *L. infantum* y de *L. donovani*, reflejando probablemente la fase de la enfermedad en la cual se encontraba el paciente. Estos resultados confirman que altos niveles de anticuerpos específicos como de no específicos de *Leishmania* son producidos durante el curso de la enfermedad [22, 23, 37], debido a la distribución de los parásitos en las vísceras de los pacientes, los cuales inducen a una pronunciada hipergammaglobulinemia en respuesta a la activación policlonal de células B [20, 38, 39] y a la inmunosupresión de la respuesta proliferativa de células Th1 frente a antígenos del parásito [40, 41].

En este trabajo el antígeno de 94 KDa presente en los extractos de *L. infantum* (Mediterráneo y Venezuela) y *L. donovani* (India), fue reconocido por el 100% de los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral, clínica, parasitológica y/o serológicamente confirmada, de variada procedencia geográfica del país. El antígeno no fue reconocido por los sueros controles negativos. Asimismo, no se observó variación en los patrones de bandas reconocidas por cada uno de los sueros, aunque si se observó entre sueros (Figura 1). Estos resultados son consistentes a los obtenidos por Rolland-Burger y col. [20], quienes al analizar la especificidad de la respuesta inmune humoral en sueros de pacientes con leishmaniasis visceral humana confirmada y casos sospechoso, así como en sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y con sueros de otras enfermedades producidas por otros protozoos, helmintos, hongos y bacterias, frente a blots de polipéptidos de cepas de *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. guyanensis* y *L. mexicana*, reportan que aunque el componente de 94-KDa está expresado en todos los perfiles polipeptídicos de diferentes especies de *Leishmania*, solamente fue reconocido en los blots de *L. infantum* y de *L. donovani* por el 100% de los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral aguda y por el 75% de los sueros de casos sospechosos. Al respecto, Rolland y col. [22] reportan además, que sueros de casos de leishmaniasis cutánea infectados por *L. brasiliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* o *L. tropica*, no reaccionaron frente a este antígeno de 94 KDa en los blots de *L. infantum* y de *L. major*; mientras que, algunos sueros de pacientes que presentaron lesiones cutáneas producidas por *L. infantum*, si desarrollaron anticuerpos anti-94KDa. En este sentido, Neogy y col.

[42], reportan ese mismo hallazgo en sueros de perros infectados con *L. infantum* y animales sospechosos cuyos sueros produjeron anticuerpos anti-94 KDa. Por otra parte, Rolland y col. [21] demostraron que en extractos axénicos de *L. mexicana* el antígeno de 94 KDa, no fue reconocido por sueros de leishmaniasis visceral humana y canina.

En Turquía, Dayangaç y col. [25], utilizando antígenos de *L. infantum*, encuentran que el polipéptido de 94 KDa es reconocido específicamente por los sueros de casos clínicos con leishmaniasis visceral humana pre y postratamiento.

En este estudio, otro antígeno, el de 70 KDa, reconocido por el 79% de los sueros de leishmaniasis visceral estudiados, no fue identificado por anticuerpos de ninguno de los sueros controles incluyendo los de las diversas formas clínicas de leishmaniasis tegumentaria. Este hallazgo se correlaciona con lo reportado por Jaffe y Zalis [43], quienes señalan que dos antígenos: 70 KDa y 72 KDa, ambos extraídos de membrana de *L. donovani*, también han sido reconocidos específicamente por anticuerpos de pacientes con leishmaniasis visceral y no por sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y enfermedad de Chagas. Asimismo, en Kenia (Africa Oriental), Okong'o-Odera y col. [44] reportan que el antígeno de 70 KDa además del de 116 KDa de promastigotos de *L. donovani* son reconocidos por sueros de pacientes con leishmaniasis visceral. Posteriormente, Okong'o-Odera y col. [45] al evaluar la especificidad de la respuesta de células T frente a este antígeno y el de 116 KDa, señalan que sueros de individuos sanos residentes en áreas endémicas, reconocen hasta en un 85,7% el de 70 KDa, proponiendo que este antígeno puede revelar infecciones subclínicas en esas regiones. En este orden de ideas, en la India, Kumar y col. [23] demuestran que ese polipéptido de 70 KDa además del de 65 KDa son reconocidos por sueros de pacientes pre- y postratamiento con Glucantime o Miltefosina, sugiriendo que estos polipéptidos pueden tener valor diagnóstico y pronóstico.

Este polipéptido de 70 KDa ha sido identificado y caracterizado como miembro de la familia de las proteínas de choque térmico, Hsp70. Recombinantes de la región carboxilo terminal de esa proteína de *L. donovani* [46] de *L. infantum* [47] y de *L. chagasi* [48] producen una fuerte respuesta inmune humoral en ELISA e Immunoblot, solo por sueros de pacientes con leishmaniasis visceral de áreas endémicas tales como Brasil y Sudan. Da Silva y col. [48] demuestran que sueros policlonales de conejos inmunizados con el recombinante de *L. chagasi* producen altos títulos de anticuerpo en test de aglutinación directa, concluyendo

que esa proteína nativa Hsp70 de *L. chagasi* está distribuida sobre la superficie del parásito.

Con respecto al polipéptido de 83 KDa, fue reconocido solo por el 58% de los sueros de pacientes con leishmaniasis visceral estudiados. En relación a este antígeno, Angel y col. [49] al analizar la secuencia de un clon expresado de una librería de cADN de promastigotos de *L. infantum*, inmunoseleccionado frente a un suero de leishmaniasis visceral canina, estimaron que el genoma de ese parásito contiene 7 genes Hsp83 organizados en tándem y que la proteína completa y subfragmentos de la proteína recombinante, LiHsp83, al ser utilizados como antígenos en un FAST-ELISA en sueros de perros con leishmaniasis visceral, encuentran que el 90% de los sueros reconocieron ese recombinante, sugiriendo que la Hsp83 de *L. infantum* o subfragmentos de la misma pueden ser útiles en el serodiagnóstico de la afección canina.

## CONCLUSIONES

1. El extracto antigénico de promastigotos de la cepa de *L. infantum* autóctona del estado Trujillo, Venezuela, demostró ser de igual reactividad y especificidad que el de *L. infantum* del Mediterráneo y el de *L. donovani* de la India. En efecto, el análisis de varianza reveló que no existen diferencias significativas en el patrón de reconocimiento de polipéptidos en los tres extractos leishmánicos por las inmunoglobulinas de los sueros con leishmaniasis visceral, por lo que se sugiere utilizar la cepa *L. infantum* de Trujillo (MHOM/VE/87/TRU-3) como antígeno en Inmunoblot.

2. La consistente detección del polipéptido de 94 KDa por el 100% de los sueros estudiados con o sin diagnóstico parasitológico, confirma que es candidato idóneo en el Inmunodiagnóstico diferencial de la afección en el país, tal como en otras regiones endémicas del viejo y nuevo mundo, mientras que los polipéptidos 70 KDa (79%) y 83 KDa (53%) pueden contribuir también al diagnóstico aunque en menor proporción.

3. El análisis factorial de correspondencias múltiples (AFCM) confirmó la formación siete grupos de variables, siendo el único de interés, la enfermedad leishmaniasis visceral (VIS) en el cual hacen correspondencias múltiples las variables: VIS y las bandas antigénicas de 94 KDa, 70 KDa y 83 KDa.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Hilda Pérez y Lic. Mercedes De La Rosa (IVIC). Dra. Haideé Urdaneta del IDIC-ULA. Dr.

Cruz Manuel Aguilar (Universidad de Carabobo) y a la Dra. Marian Ulrich, (Instituto de Biomedicina), quienes desinteresadamente proporcionaron algunos sueros. Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT-ULA, proyecto NURR-C-300-01-07-C).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Laveran A, Mesnil F. Sur un Protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav. Et Mesn.), parasite d'une fièvre de l'Inde. C. R. Acad. Sci.: Paris. 1903. p 957-961.

[2] Moreno G, Rioux JA, Lanotte G, Pratlong F, Serres E. Le complexe *Leishmania donovani* S.1. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde". In: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. Rioux JA., éd. IMEEE.: Montpellier. 1986. p 105-117.

[3] Mauricio IL, Howard MK, Stothard JR, Miles MA. Genetic diversity in the *Leishmania donovani* complex. *Parasitology*. 1999; 119: 237-246.

[4] Organización Mundial de la Salud (OMS). Control de la leishmaniasis. 118° reunión. Informe de la secretaria. 2006. EB118/4: 1-7.

[5] Torrealba JW. Observaciones sobre diagnóstico, terapéutica y evolución de la leishmaniasis visceral humana y canina. [Tesis Doctoral]. Caracas. Universidad Central de Venezuela. 1970.

[6] Zerpa O, Ulrich M, Negrón E, Rodríguez V, Centeno M, Convit J. Actualización epidemiológica de la leishmaniasis visceral en Venezuela. *Acta Cient Venez*. 2000; 51(sup. 2): 177.

[7] Zerpa O, Ulrich M, Convit J. Programa control de la leishmaniasis visceral en Venezuela. MSDS. UCV. Instituto de Biomedicina. Caracas. 2003.

[8] Zerpa O, Ulrich M, Borges R, Rodríguez V, Centeno M, Negrón E, Belizario D, Convit J. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev Pan Am Salud Pública*. 2003; 13(4): 239-245.

[9] García B, Borges R. Evaluación de conocimientos de la leishmaniasis visceral en comunidades intervenidas con el programa de control. Municipios Díaz y Gómez-Isla de Margarita del Estado Nueva Esparta. Venezuela. *Espacio Abierto Cuaderno Venezolano de Sociología*. 2010; 19(1): 79-92.

[10] De Alencar JE. Leishmaniose visceral no Brasil. *Revta Med Univ Fed Ceará*. 1978; 18: 129-148.

- [11] Thakur CP. Epidemiological, clinical and therapeutic features of Bihar kala-azar (including post kala-azar dermal leishmaniasis). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984; 78: 391-398.
- [12] Badaró R, Jones T.C, Carvalho E.M, Sampaio D, Reed S.G, Barral A, Teixeira R, Johnson Jr. W.D. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Diseases.* 1986; 154: 1003-1011.
- [13] Lee M.B, Gilbert H.M. Current approaches to leishmaniasis. *Infect Med.* 1999; 16(1): 34-45.
- [14] Malla N, Mahajan RC. Pathophysiology of visceral leishmaniasis—some recent concepts. *Indian J Med Res.* 2006; 123(3): 267-274.
- [15] Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling R.W, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(11): 873-882.
- [16] Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immuno Microbiol Infect Dis.* 2004; 27: 305-318.
- [17] Reed SG, Badaró R, Cheri Lloud RM. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. *J Immunol.* 1987; 138(5): 1595-1601.
- [18] Mary C, Lamouroux D, Dunan S, Quilici M. Western blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential of the 14-kD and 16-kD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47(6): 764-771.
- [19] Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Rahal A, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y. Use of the leishmanin skin test and Western blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes-Maritimes (France). *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 88: 658-659.
- [20] Rolland-Burger L, Rolland X, Grieve CW, Monjour L. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Leishmania donovani infantum* polypeptides in human visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29 (7): 1429-1435.
- [21] Rolland L, Zilberfarb V, Furtado A, Gentilini M. Identification of 94-kilodalton antigen of *Leishmania* promastigotes forms and its specific recognition in human and canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1994; 16: 599-608.
- [22] Rolland L, Belkaid M, Seye A, Schneider P, Gentilini M. Detection of serum antibodies against *Leishmania* 94 kDa antigen in visceral and cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Parasite.* 1995; 2: 13-21.
- [23] Kumar P, Pai K, Tripathi K, Pandey HP, Sundar S. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Leishmania donovani* polypeptides in cases of human visceral leishmaniasis: its usefulness in prognosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(5): 1119-1123.
- [24] Bucheton B, El-Safi SH, Hammad A, Kheir MM, Eudes N, Mirgani A, Desseins AJ, Mary C. Antileishmanial antibodies in an outbreak of visceral leishmaniasis in eastern Sudan: high antibody responses occur in resistant subjects and are not predictive of disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003; 97: 463-468.
- [25] Dayangaç N, Ertug S, Korkmaz M, Özensoy Töz S, Özbel Y. Evaluation of anti-*Leishmania* antibodies in Turkish patients with visceral leishmaniasis using western blotting. *Türkiye Parazitoloji Dergise.* 2004; 28(2): 69-72.
- [26] Sakru N, Korkmaz M, Ozbel Y, Ertabaklar H, Sengul M, Osenzoy Toz S. Investigation of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using western blot in an endemic area in Turkey. *New Microbiol.* 2007; 30: 13-18.
- [27] Moreno G, Scorza JV, Añez N. *Leishmania infantum* en el estado Trujillo, Venezuela. *Acta Cient Venez.* 1990; 41: 271.
- [28] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Prod Natl Acad Sci. USA.* 1979; 76: 4350-4354.
- [29] Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
- [30] Briceño E, Suárez E, Michelangi C, Feliciangeli D, Ptaiza E, Mendible J. Código de Bioética y Bioseguridad 2002. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). 2da Edición. Venezuela.
- [31] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
- [32] Bittner M, Kupferer P, Morris ChF. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Analytical Biochem.* 1980; 102: 459-471.
- [33] Batteiger B, Newhall WJ, Jones RB. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J Immunol Methods.* 1982; 55(3): 297-307.
- [34] Canavos GC. Probabilidad y Estadística. Aplicaciones y Métodos. Mac Graw Hill. 1986. p. 651.
- [35] Benzécri J. L'analyse Des Données. 2 Vls. I. La Taxinomie. 2. L'analyse Des Correspondances. 3era Ed. *Edit. Dunod.* Paris. 1980. p. 632.

[36] Lebart L, Morineau A, Fénelon J. Tratamientos estadísticos de datos. Edt. Marcombo: Boixareu DL, S.A. Barcelona-México; 1985. p 307-330.

[37] Da Matta VLR, Hoshino-Shimizu S, Dietze R, Corbett CEP. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. J of Clin Lab Anal. 2000; 14(1): 5-12.

[38] Bunn-Moreno M, Madeira ED, Miller K, Menezes JA, Campos-Neto A. Hypergammaglobulinemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. Clin Exp Immunol. 1985; 59: 427-434.

[39] Howard JD. Host immunity to leishmaniasis. In Leishmaniasis. Eds. Chang K.P. and Bray R.S. Elsevier Science Publishers, Amsterdam; 1985. p 140-162.

[40] Romagnani S. Th1/Th2 paradigm. Immunol Today. 1997; 18: 263-266.

[41] Sjölander A, Baldwin TM, Curtis JM, Handman E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response is required for generation of immunity to leishmaniasis. J Immunol. 1998; 160: 3949-3957.

[42] Neogy AB, Vouldoukis I, Silva OA, Tselentis Y, Lascombe JC, Segalen T, Rzepka D, Monjour L. Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. Am J Trop Med Hyg. 1992; 47(6): 772-777.

[43] Jaffe ChL, Zalis M. Purification of two *Leishmania donovani* membrane proteins recognized by sera from patients with visceral leishmaniasis. Mol Bioch Parasitol. 1988; 27: 53-62.

[44] Okong'o-Odera EA, Abok E, Wamachi A, Mumo J, Koech DK. Analysis of diagnostic potential of *Leishmania donovani* antigens. Discovery Innovation. 1991; 3: 67-75.

[45] Okong'o-Odera EA, Othoro CA, Wamachi AN, Orago AS, Koech DK. "Visceral leishmaniasis: activation of human T-lymphocytes by two specific *Leishmania* antigens. Afr Health Sci. 1995; 2(2): 300-303.

[46] Wallace GR, Ball AE, MacFarlane J, El Safi SH, Milles MA, Kelly JM. Mapping of a Visceral Leishmaniasis-Specific Immunodominant B-Cell Epitope of *Leishmania donovani* Hsp70. Infec Immun. 1992; 60(7): 2688-2693.

[47] Quijada L, Requena JM, Soto M, Alonso C. Analysis of the antigenic properties of the *L. infantum* Hsp70: design of synthetic peptides for specific serodiagnosis of human leishmaniasis. Immunology Letters. 1998; 63(3): 169-174.

[48] Da Silva EC, Rayol CD, Moura PM, Andrade PP. Partial purification, immunogenicity and putative new localization of a native *Leishmania* heat shock protein 70. Parasitol latinoam. 2008; 63: 4-11.

[49] Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D, Alonso C. During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83 KDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. Acta Tropica. 1996; 62(1): 45-56.