

## RESUMO DE TESE

### CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE LEISHMANIA ISOLADAS DAS DIVERSAS FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE HUMANA NO ESTADO DA BAHIA.

No presente estudo foram isoladas, e caracterizadas, 114 cepas de *Leishmania* de pacientes com diferentes manifestações clínicas de leishmaniose, de diferentes regiões do Estado da Bahia. Todas as cepas foram classificadas em 3 sub-espécies: *Leishmania donovani* (*chagasi*) (n=35), *Leishmania braziliensis braziliensis* (n=39) e *Leishmania mexicana amazonensis* (n=40). Em alguns municípios foram isolados parasitas pertencentes a diferentes subespécies, porém não foi isolado mais de um tipo de parasita do mesmo paciente. Todas as cepas foram tipadas com painéis de anticorpos monoclonais, específicos para diversas espécies e sub-espécies de *Leishmania*, das Américas e do Velho Mundo. As determinações do zimodema e do esquizodema confirmaram, em todos os casos nos quais foram realizados, a tipagem obtida com o painel de anticorpos monoclonais. Os parasitas da mesma sub-espécie, a despeito da região de isolamento, foram homogêneos tanto no padrão de reatividade com os anticorpos monoclonais (determinação do serodema), quanto nas isoenzimas (zimodema) ou no perfil dos fragmentos de restrição do DNA cinetoplástico (esquizodema).

Na Amazônia a *L. m. amazonensis* é considerada um parasita de roedores, o qual somente de forma ocasional infecta o homem. Nossos dados mostram uma alta percentagem de casos humanos nos quais foi isolada a *L. m. amazonensis*, e que este parasita está associado a diferentes formas clínicas da doença, incluindo a forma cutânea (n=20), mucocutânea (n=5), e mesmo as formas visceral (n=11) e a leishmaniose dérmica pós-calazar (n=4).

O principal agente da leishmaniose visceral foi a *L. donovani* (*chagasi*), isolada de 35 dos 46 casos explicados. Não houve qualquer distinção aparente entre os quadros clínicos de leishmaniose visceral causada pela *L. donovani* (*chagasi*) ou pela *L. m. amazonensis*.

A *L. b. braziliensis* foi isolada de 29 casos de leishmaniose cutânea e 8 casos de leishmaniose cutâneo-mucosa. Esta subespécie foi também isolada de dois linfonodos aumentados de volume, em dois pacientes sem qualquer envolvimento tegumentar ou manifestação de leishmaniose visceral.

A leishmaniose muco-cutânea ou cutânea causada pela *L. b. braziliensis* ou pela *L. m. amazonensis* foi similar clinicamente. Exceto pela observação de que nos casos com múltiplas lesões (acima de 5) o

### PHENOTYPE AND GENOTYPE CHARACTERIZATION OF STRAINS OF LEISHMANIA ISOLATED IN THE DIFFERENT CLINICAL FORMS OF HUMAN LEISHMANIASIS IN BAHIA STATE.

In this study 114 strains of *Leishmania* were isolated and characterised. These strains were obtained from patients with clinical manifestations of leishmaniasis and from different areas of the State of Bahia. All 114 isolates belonged to one of 3 species: *Leishmania donovani* (*chagasi*) (n=35), *Leishmania braziliensis braziliensis* (n=39) and *Leishmania mexicana amazonensis* (n=40). More than one parasite strain was isolated in some Municipalities, but never from a single case. Parasites of the same species from different geographical areas were homogeneous in monoclonal antibody reactivity pattern (serodeme), isoenzyme profiles (zymodeme), and kDNA restriction fragments profiles (schizodeme). Zymodeme and schizodeme always confirmed the characterization performed by a panel of species and sub-species-specific monoclonal antibodies against New World and Old World leishmaniae.

In the Amazonian region *L. m. amazonensis* is considered a parasite of rodents, rarely infecting man. In this study, however, a high percentage of human cases were caused by this sub species. *L. m. amazonensis* was isolated from many different clinical presentations of the disease, including cutaneous lesions (n=20), muco-cutaneous lesions (n=5) and, of note, visceral leishmaniasis (n=11) and post kala-azar dermal leishmaniasis (n=4).

The principal parasite agent of visceral leishmaniasis, however, was *L. donovani* (*chagasi*), isolated in 35 out of 46 cases. No clinical difference between cases caused by *L. donovani* (*chagasi*) or by (*L. m. amazonensis*) was apparent.

*L. b. braziliensis* was isolated from cutaneous (n=29) and muco-cutaneous (n=8) leishmaniasis. This parasite was also isolated from enlarged lymph nodes of two patients without apparent tegumentary involvement.

Leishmaniasis, either cutaneous or muco-cutaneous, caused by *L. b. braziliensis* or *L. m. amazonensis* were clinically similar, except for the higher frequency of *L. m. amazonensis* isolated from cases with multiple (more than five) lesions. In addition, there was no difference in the histopathological pattern of lesions caused by the 2 sub-species. Distribution of lymphocyte subpopulations in the lesion infiltrates were also similar regardless of the parasite sub-species involved.

In order to evaluate the homogeneity of the *L. m. amazonensis* strains causing different forms of the

isolamento de *L. m. amazonensis* ocorreu com maior frequência. Não houve qualquer diferença no padrão histopatológico das lesões causadas pelas duas subespécies de parasitas. A distribuição das subpopulações linfocitárias no infiltrado inflamatório das lesões foi semelhante a despeito do tipo de parasita isolado.

Diversas cepas de *L. m. amazonensis*, isoladas de diferentes formas clínicas e de diversas regiões do Estado, exibiram um padrão de composição protéica semelhante na eletroforese em gel de poliacrilamida, e um padrão semelhante de reatividade com os anticorpos monoclonais na técnica de imunoeletrtransferência, confirmando a sua homogeneidade revelada pelo ensaio radioimunológico.

A caracterização "in situ" da *L. m. amazonensis* nas lesões de leishmaniose cutânea ou cutâneo-mucosa, assim como de leishmaniose cutânea difusa e de leishmaniose dérmica pós-calazar, foi realizada pela técnica de imunoperoxidase, usando anticorpo monoclonal específico para a forma amastigota de *L. m. amazonensis*. A caracterização, realizada pelo método imuno-histoquímico, confirmou a classificação, realizada por anticorpos monoclonais e por isoenzimas, nas promastigotas de cultura de parasitas isoladas dos mesmos casos.

Os resultados aqui apresentados ilustram a dificuldade de caracterizar as espécies de *Leishmania* com base nos aspectos clínicos, já que o mesmo parasita pode ser isolado de diferentes formas clínicas da doença. Desde que diferentes subespécies de parasitas podem responder de forma diferente ao tratamento, é aconselhável que se realize o isolamento, e caracterização, parasitárias nos casos de leishmaniose humana. A determinação de serodemas através da reação com anticorpos monoclonais apropriados, é uma técnica útil para esta caracterização e pode ser realizada nos parasitas em cultura logo após o isolamento. Ainda mais promissora, do ponto de vista de aplicação prática, é a possibilidade de realizar a tipagem parasitária no próprio tecido da biópsia da lesão, usando anticorpos monoclonais específicos para as diversas subespécies.

disease several isolates from different clinical cases, and from different areas, were tested by methods other than serodeme and zymodeme determination. All tested isolates exhibited similar protein profile by SDS-selyaorylamide gel electrophoresis, and a similar pattern of activity with different monoclonal antibodies by Western blot.

In attempt to develop a more efficient method for species characterization "in situ" characterization of *L. m. amazonensis* in the lesions of cutaneous and muco-cutaneous leishmaniasis was performed by immunoperoxidase technique using anti *L. m. amazonensis* amastigote specific monoclonal antibody. Such characterization was coincident with the typing of promastigote cultures, both serodeme and zymodeme determinations, of parasites from the same cases.

These results demonstrate that *Leishmania* species cannot be characterized on clinical grounds, since different parasites may be isolated from indistinguishable disease presentations. This characterization of *Leishmania* sub-species is of importance, as sub-species may vary in their response to treatment. Monoclonal antibody serodeme determination is a useful technique which can be performed in the initial passages of the parasite in culture. A more rapid approach is the possibility of typing the parasite in the lesion tissues using stage and sub-species specific monoclonal antibodies.