Development of specific diagnostic marker for leishmaniasis

Abhishek Dey

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL), caused by the protozoan parasite *Leishmania donovani*, is fatal if left untreated. The gold standard for diagnosis relies on microscopic detection of parasites in bone marrow or splenic aspirates, which is an invasive procedure and requires hospitalisation with possibilities of morbidity due to internal bleeding. The rK-39-based diagnostics have performed well in the Indian subcontinent but have shown reduced sensitivity in populations from eastern Africa and Brazil. Thus, there is a need for an alternative diagnostic antigen with broad applicability, high sensitivity and specificity for VL. In the present study, we have evaluated Hemoglobin receptor (HbR) of *Leishmania donovani* as a novel diagnostic antigen for VL.

We have purified recombinant HbR as a GST fusion protein and in tag-free form. We have used both antigens in analysing large numbers of VL and non-VL patient sera to develop a diagnostic process for VL by ELISA and Dot Blot. Initial studies with 125 confirmed VL sera and 126 non-VL control sera using GST-HbR have shown 88.8% sensitivity and 90.4% specificity with negligible cross-reactivity against malaria and tuberculosis sera by ELISA. However, tag-free HbR has shown 95.58% sensitivity and 98.25% specificity by ELISA using larger cohort of 272 confirmed VL sera and 287 non-VL sera and these results are comparable with rK-39.

Subsequently, we have developed a simpler Dot blot assay by immobilising HbR on nitrocellulose membrane which may be suitable for in field application. GST-HbR by Dot blot assay shows 99.2% sensitivity from the analysis of 125 confirmed VL sera and 126 non-VL control sera. Using tag-free HbR against 274 confirmed VL sera and 288 non-VL controls by Dot blot, we obtain a sensitivity of 93.4% which significantly exceeds the 87.5% of rK-39. However, the specificity of HbR (89%) is found relatively lower than that of rK-39 (99.6%). This is due to the fact that HbR also detect the signals from apparently normal individuals who are from endemic region or may have suffered VL previously which is potentially important advantage for endemic surveillance. In addition, HbR also detects signals from some malaria and tuberculosis patients' sera, which is a major advantage as rK-39 sensitivity reduces in coinfection. These findings demonstrate that HbR is a novel antigen and can be used for diagnosis of VL.

सार

विसरल लीशमैनियासिस (VL), जो प्रोटोज़ोअन परजीवी लीशमानिया डोनोवानी *(Leishmania donovani)* द्वारा उत्पन्न होता है, यदि उपचार न किया जाए तो घातक सिद्ध होता है। इसके निदान का स्वर्ण मानक अस्थि मज्जा अथवा प्लीहा ऊतक में परजीवियों की सूक्ष्मदर्शी जाँच पर निर्भर करता है, जो एक आक्रामक (invasive) प्रक्रिया है और इसके लिए अस्पताल में भर्ती होना आवश्यक है, साथ ही आंतरिक रक्तस्राव के कारण मृत्यु की संभावना भी बनी रहती है। rK-39 आधारित निदान परीक्षण भारतीय उपमहाद्वीप में अत्यंत प्रभावी सिद्ध हुए हैं, किन्तु पूर्वी अफ्रीका और ब्राज़ील की जनसंख्या में इनकी सेंसिटिविटी (sensitivity) कम पाई गई है। अतः एक वैकल्पिक निदान प्रतिजन (diagnostic antigen) की आवश्यकता है जो व्यापक रूप से उपयोगी हो तथा VL के लिए उच्च सेंसिटिविटी एवं स्पेसिफिसिटी (specificity) रखता हो। प्रस्तुत अध्ययन में हमने लीशमानिया डोनोवानी के हीमोग्लोबिन रिसेप्टर (Hemoglobin receptor, HbR) का एक नवीन निदान प्रतिजन के रूप में मूल्यांकन किया है। हमने पुनर्संयोजी HbR (recombinant HbR) को GST फ्यूजन प्रोटीन (GST fusion protein) के रूप में तथा tag-रहित (tag-free) रूप में अलग (purify) किया है। दोनों प्रतिजनों का उपयोग VL एवं non-VL रोगियों के बड़ी संख्या में सीरम (sera) नमूनों के विश्लेषण में ELISA और Dot Blot द्वारा VL के निदान की प्रक्रिया विकसित करने हेतु किया गया है। 125 पुष्टीकृत (confirmed) VL सीरम और 126 non-VL कंट्रोल (control) सीरम के साथ GST-HbR का उपयोग करते हुए प्रारंभिक अध्ययनों में ELISA द्वारा 88.8% सेंसिटिविटी और 90.4% स्पेसिफिसिटी प्राप्त हुई, तथा मलेरिया और तपेदिक (tuberculosis) सीरम के विरुद्ध ना के बराबर क्रॉस-रिएक्टिविटी (cross-reactivity) देखी गई। तथापि, tag-रहित HbR ने 272 पुष्टीकृत VL सीरम और 287 non-VL सीरम के बड़े समूह का अध्ययन करते हुए ELISA द्वारा 95.58% सेंसिटिविटी और 98.25% स्पेसिफिसिटी प्रदर्शित की, जो rK-39 के परिणामों के तुलनीय है।

तत्पश्चात, हमने नाइट्रोसेलुलोज़ मेम्ब्रेन (nitrocellulose membrane) पर HbR को स्थिरीकृत करके एक सरल Dot blot परख (assay) विकसित की है, जो क्षेत्र उपयोग (field application) के लिए उपयुक्त हो सकती है। GST-HbR के Dot blot द्वारा 125 पुष्टीकृत VL सीरम और 126 non-VL कंट्रोल सीरम के विश्लेषण से 99.2% सेंसिटिविटी प्राप्त हुई। 274 पुष्टीकृत VL सीरम और 288 non-VL कंट्रोल के विरुद्ध Dot blot द्वारा tag- रहित HbR का उपयोग करने पर 93.4% सेंसिटिविटी प्राप्त हुई, जो rK-39 की 87.5% सेंसिटिविटी से महत्वपूर्ण रूप से अधिक है। हालाँकि, HbR की स्पेसिफिसिटी (89%) rK-39 (99.6%) की तुलना में अपेक्षाकृत कम पाई गई। इसका कारण यह है कि HbR उन प्रतीत रूप

से सामान्य व्यक्तियों से भी संकेत (signal) ग्रहण करता है जो स्थानिक क्षेत्र (endemic region) से हैं अथवा जो पूर्व में VL से पीड़ित हो चुके हैं , जो स्थानिक निगरानी (endemic surveillance) के लिए एक संभावित महत्वपूर्ण लाभ है। इसके अतिरिक्त, HbR कुछ मलेरिया और तपेदिक रोगियों के सीरम से भी संकेत प्रदर्शित करता है, जो एक प्रमुख लाभ है क्योंकि सह-संक्रमण (co-infection) की स्थिति में rK-39 की सेंसिटिविटी घट जाती है।

ये खोज दर्शाते हैं कि HbR एक नवीन प्रतिजन है और इसका उपयोग VL के निदान में किया जा सकता है।