ISSN 0025-7680

ARTICULO ORIGINAL

MEDICINA (Buenos Aires); 1996 56: 259-268

ESTUDIO DE CASOS DE LEISHMANIASIS EN LA PROVINCIA DE SALTA

EVIDENCIAS DE INFECCION MIXTA POR *TRYPANOSOMA CRUZI* Y *LEISHMANIA SPP*

MONICA G. CHIARAMONTE[1], NORBERTO W. ZWIRNER[1], SILVIA L. CAROPRESI[3], VIVIANA HEREDIA[3], NESTOR J. TARANTO[2], EMILIO L. MALCHIODI[1]

[1] Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; [2] Hospital S. V. de Paul, Orán, Salta, Universidad de Salta; [3] Hospital J. D. Perón, Tartagal, Salta

Resumen En numerosas regiones del Continente Americano y aun de Argentina existe superposición de áreas endémicas de dos importantes parasitosis como son la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis. Los parásitos causantes de ambas pertenecen a la misma familia (*Trypanosomatidae*) por lo que el diagnóstico serológico diferencial con antígenos convencionales se ve dificultado por la existencia de fenómenos de reactividad cruzada. En este trabajo estudiamos pacientes provenientes de una zona endémica para ambas parasitosis (Tartagal-Orán, Salta) que consultaron por lesiones cutáneas o mucocutáneas compatibles con leishmaniasis. El estudio de los sueros, utilizando Ag complejos de *Leishmania*, mostró inusualmente altos porcentajes de positividad para pacientes leishmaniásicos. El análisis empleando pruebas convencionales frente a Ag heterólogos complejos de *T. cruzi*, reveló que la mayoría daban positivas estas reacciones. La utilización de 2 técnicas no convencionales para el diagnóstico de enfermedad de Chagas, permitió dividir los pacientes en 2 grupos: 1. Con evidencias de infección por *T. cruzi:* aquellos que dieron positivo en ELISA utilizando un Ag específico purificado con un Ac monoclonal (Ag163B6) o que presentaban un patrón de bandas característico de pacientes chagásicos por «immunoblotting» frente a epimastigotes; 2. Pacientes sin evidencias de infección por *T. cruzi:* aquellos negativos para ambas técnicas. Se pudo comprobar así que más del 50% de los leishmaniásicos presentaba fuertes evidencias de una infección concomitante con *T. cruzi.* Además, el alto grado de reactividad cruzada quedó de manifiesto en el grupo de pacientes sin evidencia de infección por *T. cruzi*, ya que el 60% dio positivas al menos 2 reacciones convencionales considerándoselos por ende como chagásicos, pero dieron negativas ambas reacciones específicas. Estos resultados destacan la importancia de contar con Ag definidos y técnicas apropiadas para el diagnóstico serológico diferencial de estas parasitosis, lo cual cobra mayor importancia en las zonas donde ambas son endémicas.

Palabras clave: leishmaniasis, enfermedad de Chagas, reactividad cruzada, infección mixta, diagnóstico diferencial

La leishmaniasis es una parasitosis producida por los protozoarios del género *Leishmania* que, según la especie causante, puede producir manifestaciones clínicas del tipo cutánea, mucocutánea o visceral. El conocimiento de la existencia de leishmaniasis en nuestro país se remonta a informes del año 1916[1], aunque todavía hoy la prevalencia e incidencia de esta enfermedad no son conocidas ampliamente. Sin embargo, la aparición de más de 500 casos en la provincia de Salta a partir de 1985, determinó un aumento del interés sobre su importancia.

Las manifestaciones cutáneas de esta enfermedad, en general no tienen consecuencias graves para la salud humana, aunque las lesiones

- - - -
Recibido: 25-VII-1995 Aceptado: 19-X-1995

Dirección postal: Dr. Emilio L. Malchiodi, Cátedra de Inmunología, Junín 956, 4° p, 1113 Buenos Aires, Argentina

pueden ser muy deformantes. Esto se produce fundamentalmente por la posibilidad de que, concomitantemente con la aparición de lesiones cutáneas, o aún después de su curación, puedan aparecer lesiones mucocutáneas, que afectan principalmente a la mucosa nasal y bucal («nariz de tapir»), con pronósticos más graves para la salud del paciente. Los estudios realizados hasta el momento demuestran que la especie *Leishmania braziliensis* es la predominante en Argentina[2] y ésta sería la causante de la aparición de lesiones mucocutáneas[3].

Las zonas geográficas de nuestro país donde se han registrado casos de leishmaniasis (Salta, Chaco), se superponen con áreas endémicas de otra parasitosis de gran prevalencia en la Argentina como es la enfermedad de Chagas, que afecta en nuestro país a aproximadamente 3 millones de personas y que constituye un grave problema de salud pública.

Debido a esta superposición, sería factible la existencia de pacientes sufriendo una infección doble por ambos parásitos. Varios autores han sugerido la presencia de pacientes con infección mixta. En estos casos, la infección por *Leishmania* fue diagnosticada por la detección directa del parásito en las lesiones, en cambio la infección por *T. cruzi* sólo ha sido sugerida por la reactividad positiva frente a antígenos complejos de *T. cruzi* o la presencia de alteraciones cardíacas[4-6].

Las reacciones serológicas convencionales (HAI, AD, IFI, ELISA) empleadas para el diagnóstico de enfermedad de Chagas, utilizan como Ag el parásito entero o fracciones subcelulares de los mismos, lo que provoca errores diagnósticos debido a la existencia de Ag de reactividad cruzada. El uso de Ag purificados y específicos aparece entonces como única alternativa para un diagnóstico seguro y confiable.

En nuestro laboratorio hemos purificado por inmunoafinidad, empleando un AcMo, el Ag163B6[7], específico de *T. cruzi* y que sería idéntico[8] a la principal cistein proteinasa del parásito aislada por Cazzulo y col[9], la cruzipaína. Utilizando este Ag en un ELISA convencional, fue posible distinguir entre sueros de pacientes chagásicos crónicos y leishmaniásicos[7]. Por otra parte, determinamos por «immunoblotting» que los sueros de pacientes chagásicos crónicos presentaban un patrón de bandas característico frente a epimastigotes de *T. cruzi* que permite diferenciarlos del que presentan los leishmaniásicos frente al mismo Ag, a pesar de la reactividad cruzada[10].

En este trabajo estudiamos pacientes provenientes de una zona endémica para leishmaniasis y tripanosomiasis (Tartagal, Orán y zonas aledañas, provincia de Salta), que consultaron por lesiones cutáneas y mucocutáneas características de leishmaniasis. El objetivo fue analizar el suero de estos pacientes frente a Ag homólogos, para evaluar la respuesta inmune humoral desencadenada por la infección, frente a Ag heterólogos complejos, para determinar la incidencia del fenómeno de reactividad cruzada y frente a Ag específicos de *T. cruzi*, para investigar la presencia de infección mixta.

Materiales y métodos

Pacientes

El estudio se realizó sobre una población de 14 mujeres y 48 hombres, con edades entre 8 y 70 años, provenientes de la provincia de Salta, que concurrieron a la consulta médica por presentar lesiones típicas de leishmaniasis. La intradermorreacción de Montenegro (IDR) se realizó por inyección intradérmica de 0,1 ml de leishmanina (40 g de nitrógeno proteico/ml)[11] y la lectura se realizó a las 48 horas. Las induraciones mayores de 5 mm fueron consideradas como reacciones positivas. El diagnóstico parasitológico se realizó por la visualización de amastigotes en frotis del material tomado del borde de la lesión, teñidos con Giemsa.

Se analizaron también sueros de pacientes chagásicos crónicos provenientes del centro de la provincia de Santa Fe (Argentina), zona no endémica para leishmaniasis y donde nunca se ha diagnosticado tal enfermedad. Estos pacientes presentaban reacción positiva en los ensayos convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (HAI, IFI, ELISA).

Como controles negativos se emplearon sueros de donantes sanos.

Parásitos

Los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen, fueron cultivados en medio bifásico libre de células[12].

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* se cultivaron en medio líquido[13].

Tanto los epimastigotes como los promastigotes fueron cosechados en fase exponencial, y centrifugados 15 min a 8.000 rpm a 4°C. Luego fueron lavados 3 veces con NaCl 0,15 M y 0,01 M fosfatos pH = 7,4 (SFT) y tratados como se describe luego, para su empleo en las distintas reacciones.

Obtención de fracciones antigénicas solubles de T. cruzi *y* L. mexicana

Epimastigotes de *T. cruzi* y/o promastigotes de *L. mexicana* fueron sometidos a 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento, luego de lo cual fueron tratados con una solución de 0,25 M sacarosa y 5 mM KCl conteniendo inhibidores de proteasas (2 µM PMSF, 5 µM leupeptina, 5 µM E-64, 5 µM pepstatina) y centrifugados a 6.000 xg 10 min, el sobrenadante obtenido (S1) se separó y el sedimento fue nuevamente tratado con la solución anterior y centrifugado 10 min a 17.000 xg. El sobrenadante de esta última centrifugación junto con el S1 se centrifugaron 30 min a 45.000 xg. El sobrenadante obtenido fue denominado F45.

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford con seroalbúmina bovina como standard[14].

Obtención de un antígeno purificado de T. cruzi

El Ag163B6 específico de *T. cruzi* fue obtenido como fuera descripto. Brevemente, el anticuerpo monoclonal (AcMo 163B6) purificado[7], se fijó a Sepharosa 4B-BrCN[15], y esto fue utilizado como inmunoadsorbente de la fracción F45 de *T. cruzi*. El Ag retenido por la columna fue eluido con buffer 0,2M glicina-HCl pH = 3, dializado contra SFT y conservado a -70°C hasta su uso.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Epimastigotes de *T. cruzi* o promastigotes de *L. mexicana* formolados (10.000 parásitos por pocillo del portaobjetos) fueron usados para realizar los ensayos de inmunofluorescencia indirecta según Alvarez y col[16]. Los sueros se ensayaron en diluciones seriadas en razón 2 desde 1/30. Como segundo anticuerpo se empleó fragmento Fab'_2 anti-γ-globulina humana total marcada con fluoresceína (Pasteur) en una dilución 1/50 en Azul de Evans al 0,005% en SFT.

Enzimoinmunoensayo (ELISA)

La técnica de ELISA indirecto[17] se empleó para la valoración semicuantitativa de los sueros. Las placas fueron sensibilizadas con F45 de *L. mexicana* en una concentración de 4 µg/ml. Los sueros se ensayaron en diluciones seriadas en razón 3. El título de cada suero se determinó como la inversa de la dilución que da el 50% de la absorbancia máxima.

Frente a los Ag F45 y Ag163B6 de *T. cruzi*, los sueros se ensayaron en una dilución 1/1.000. Se consideraron positivos aquellos sueros con DO 492nm mayor al valor promedio de la DO de los controles negativos más 3 desvíos standard.

En los dos casos un conjugado anti-γ-globulinas humanas totales-peroxidasa fue utillizado como segundo anticuerpo en una dilución 1/4.000.

Hemaglutinación indirecta (HAI)

Se realizó según las indicaciones del reactivo comercial (Polychaco®).

SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia («Immunoblotting»)

Epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. mexicana*, fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida en presencia de SDS utilizando el método discontinuo descripto por Laemmli[18]. Se utilizaron geles de "stacking" al 3% y geles de separación al 7,5% de acrilamida-bisacrilamida.

Los parásitos tratados con buffer muestra para SDS-PAGE (0,37 M Tris-HCL, 2% SDS, 10% glicerina, 1% azul de bromofenol en H_2O destilada) conteniendo inhibidores de proteasas (2 mM PMSF, 5 µM E-64, 5 µM leupeptina, 5 µM pepstatina) fueron calentados a 100°C por 3 min y sometidos a una corrida electroforética a 200 voltios durante 1 hora en un equipo Mini Protean II (Bio-Rad). Posteriormente se realizó la transferencia a nitrocelulosa durante 1,5 hs a 300 mA en un equipo Trans Blot (Bio-Rad), según el método de Towbin[19].

Luego del bloqueo con una solución de leche descremada al 0,5% en 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH = 7,4 (TBS-L) la nitrocelulosa cortada en tiras de 4 mm, se incubó con los sueros humanos infectados diluidos 1/500 en TBS-L durante 1 hora a T amb y con agitación. Como segundo Ac se utilizó anti-γ-globulina humana-peroxidasa (DAKO) diluida 1/4.000 en TBS-L. El agregado de sustrato-cromógeno, H_2O_2/4-Cl-1-naftol, se realizó luego de los correspondientes lavados con TBS. El desarrollo de color fue interrumpido por lavados con H_2O destilada.

La determinación de PM se realizó usando una curva de calibración con patrones de PM (Sigma) que fueron revelados por tinción con Ponceau S.

Resultados

Se estudiaron pacientes que presentaron al momento de la consulta, lesiones compatibles con leishmaniasis. El criterio de inclusión en este estudio fue la visualización de amastigotes en frotis de material tomado del borde de las lesiones y/o reacción positiva en la intradermorreacción de Montenegro.

De los 62 pacientes incluidos, 57 presentaban lesiones cutáneas únicas (38) o múltiples (19) y

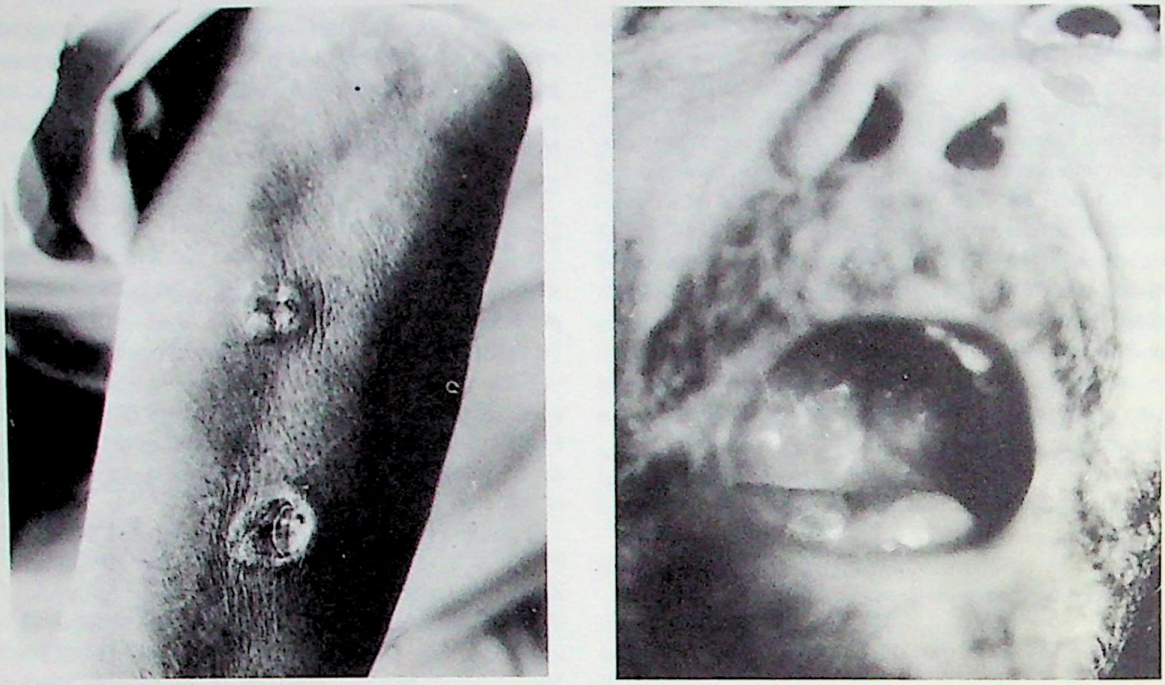

Fig. 1.— Lesiones causadas por *Leishmania*. A: Lesiones cutáneas características con bordes sobreelevados, violáceos y fondo granulomatoso; B: Espundia, lesión mucocutánea con pérdida total del tabique nasal, edema e hiperemia de paladar blando. Nótese la cruz de la espundia que sirve como criterio de diferenciación entre una leishmaniasis mucosa producida por primoinfección y una lesión metastásica post-leishmaniasis cutánea de evolución no menor a 2 años. Comienza generalmente con destrucción del tabique nasal y desciende por fauces instalándose en paladar blando demarcando una cruz en el fondo.

5 presentaban lesiones mucocutáneas en la cavidad bucal, labios, nariz o cavidad nasal (Figura 1 A y B). Las lesiones cutáneas se localizaron principalmente en rostro, brazos, piernas o torso. Los tiempos de evolución de las lesiones variaban entre 15 días hasta 1,5 años, con un promedio de 3 meses.

En la Tabla 1 (columna 1) se puede observar un resumen de los resultados obtenidos en este estudio. Así, 53 de los 62 pacientes analizados (85,48%) presentaban amastigotes en el frotis del material tomado de las lesiones. La evaluación por medio de la intradermorreacción de Montenegro mostró reactividad positiva con el 100% de los pacientes.

En la misma Tabla (columna 1) se pueden observar los resultados obtenidos del análisis serológico frente a antígenos de *Leishmania*. Por IFI frente a promastigotes formolados, 60/62 pacientes presentaban fluorescencia positiva con títulos de Ac comprendidos entre 30 y 960. Por ELISA, un 88,7% (55/62) de los individuos mostró la presencia de Ac circulantes contra Ag de una fracción sobrenadante de 45.000 xg de promastigotes lisados. Por «immunoblotting» frente a promastigotes, 50 pacientes dieron reacción positiva reconociendo antígenos de diferentes PM. Los sueros diferían en el número de bandas y en la intensidad de la reacción, no pudiéndose encontrar por lo tanto un patrón de reactividad característico (Figura 2).

Los sueros fueron estudiados también frente a antígenos complejos de *T. cruzi* en pruebas convencionales utilizadas habitualmente para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Tabla 1, columna 1). Por IFI con epimastigotes formolados, 57 de 62 sueros de pacientes leishmaniásicos presentaban Ac contra este estadío, con títulos de 30 a 960. Por ELISA con una fracción compleja de epimastigotes (F45), se encontraron 47/62 pacientes con reacción positiva. En el ensayo de hemaglutinación indirecta empleando glóbulos

TABLA 1.— *Análisis de los pacientes leishmaniásicos utilizando técnicas parasitológicas e inmunológicas con antígenos de Leishmania y T. cruzi. Columna 1: se indica el número de pacientes positivos para cada ensayo de los 62 incluidos en el estudio. Con los resultados obtenidos en las pruebas de serología específica para Chagas, los pacientes se clasificaron en dos grupos: Sin evidencia de infección por T. cruzi (Columna 2), aquellos que dieron negativos ambos ensayos y Con evidencia de infección por T. cruzi (Columna 3), aquellos que dieron positivo al menos uno de estos ensayos.*

		(1) Pacientes leishmaniásicos (n = 62)	(2) Sin evidencia de infección por *T. cruzi* (n = 30)	(3) Con evidencia de infección por *T. cruzi* (n = 32)
Serología para leishmaniasis	Frotis	53	26	27
	IDR	62	30	32
	IFI	60	28	32
	ELISA (Ag derivados de promastigotes)	55	23	32
	«Immunoblotting»	50	19	31
Serología convencional para Chagas (Ag derivados de epimastigotes)	IFI	57	25	32
	ELISA	47	15	32
	HAI	46	15	31
Serología específica para Chagas	Pacientes con al menos 2 reacciones positivas	50	18	32
	ELISA con Ag 163B6	31	0	31
	«Immunoblotting» característico de chagásico	32	0	32

rojos sensibilizados con una mezcla compleja de *T. cruzi*, se observó que 46 de 62 pacientes presentaban aglutinación positiva.

Por otra parte, los sueros de esos pacientes leishmaniásicos fueron analizados frente a Ag de *T. cruzi* pero empleando técnicas no convencio-

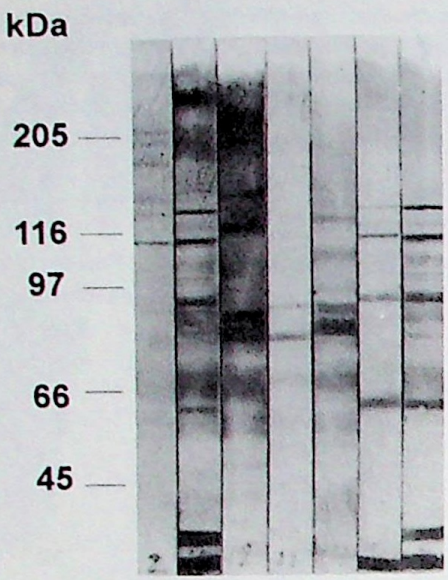

Fig. 2.— Reactividad de sueros leishmaniásicos frente a promastigotes *de L. mexicana* por «immunoblotting». Algunos sueros reconocen antígenos del mismo peso molecular pero no existen antígenos que sean reconocidos por todos los sueros, por lo que no puede establecerse un patrón de reactividad característico de leishmaniasis. A la izquierda se indican los marcadores de peso molecular.

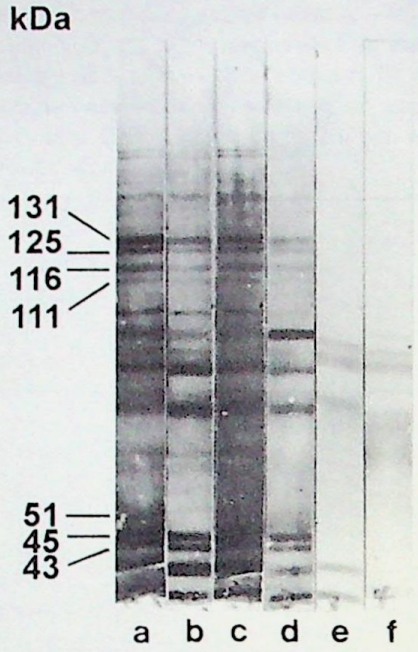

Fig. 3.— Reactividad por «immunoblotting» frente a epimastigotes de *T. cruzi* de distintos grupos de pacientes. *a* y *b*: sueros de chagásicos crónicos; *c* y *d*: sueros de leishmaniásicos clasificados como portadores de infección crónica con *T. cruzi* ya que reconocen las bandas indicadas a la izquierda como características de infección chagásica; *e* y *f*: sueros de leishmaniásicos sin evidencia de infección por *T. cruzi*.

nales y específicas para el diagnóstico de enfermedad de Chagas (Tabla 1, columna 1). Cuando se analizaron frente a un Ag purificado específico de *T. cruzi*, el Ag163B6, 31 de los 62 presentaban Ac específicos en suero contra este Ag. Usando «immunoblotting» con epimastigotes de *T. cruzi*, se observó que 32 de los 62 pacientes presentaban un patrón de reactividad semejante al presentado por los sueros de pacientes chagásicos utilizados como controles. Este patrón se caracteriza por la reactividad frente a los Ag de Mr 131, 125, 116, 111, 51-45 y 43 kDa (Figura 3 a, b, c, d). Treinta y uno de estos pacientes con «immunoblotting» positivo eran los mismos que dieron ELISA positivo frente al Ag163B6. El suero de los 30 pacientes restantes, a pesar de reconocer numerosos Ag en *T. cruzi*, presentaba una reactividad distinguible a simple vista del patrón chagásico característico (Figura 3, e y f).

Con los resultados frente a estas técnicas específicas para infección con *T. cruzi*, se clasificó a los pacientes leishmaniásicos en 2 grupos (Tabla 1): los que presentaban evidencia de infección mixta (columna 3), dada por la positividad frente al Ag163B6 y/o patrón de reactividad característico de chagásico por «immunoblotting» y otro grupo que sólo tenía evidencia de infección por *Leishmania* (columna 2) al ser negativos para las técnicas anteriores.

La división en estos 2 grupos no mostró diferencias en los porcentajes de positividad en frotis ni en IDR. Sin embargo, en lo que respecta a serología para leishmaniasis se observaron diferencias entre ambos grupos. El 100% (32/32) de los pacientes con evidencias de infección por *T. cruzi* (Tabla 1, columna 3) reaccionó positivamente por IFI y ELISA (comparar con 93,3 (28/30) y 76,7% (23/30) en columna 2) y el 96,8% (31/32) dio reacción positiva por «immunoblotting» frente a Ag de promastigotes de leishmanias (comparar con 63,3% (19/30) en columna 2).

Más marcadas aún fueron las diferencias cuando se comparan los porcentajes de positividad entre ambos grupos en la serología convencional para Chagas, donde el grupo de pacientes con evidencias de infección por *T. cruzi* presentó porcentajes del, o cercanos al, 100% contra el 83,3% (25/30) para IFI y 50% para HAI y ELISA de los pacientes sin evidencia. Comparando la respuesta inmune de los 2 grupos, pudimos observar que los pacientes con infección sólo por *Leishmania* presentaron por IFI y ELISA con Ag homólogos, títulos más bajos que los pacientes con infección mixta. Esto podría deberse a la alta respuesta en Ac desarrollada frente a la infección por *T. cruzi* y a la existencia de reactividad cruzada entre ambos tripanosomátidos. Sin embargo, y pese a las diferencias de porcentajes entre los grupos, se pudo comprobar que de los 30 pacientes leishmaniásicos que no daban reactividad positiva frente a Ag específicos de *T. cruzi*, 18 daban positivas por lo menos 2 reacciones serológicas convencionales para el diagnóstico de Chagas (Tabla 1, columna 2).

Discusión

La existencia de infección por *Leishmania* en nuestro país es un hecho muy poco difundido. A pesar de encontrarse en la nómina de enfermedad infecciosas de notificación obligatoria según el sistema nacional de vigilancia epidemiológica[20], las cifras informadas son escasas, por lo que no puede tenerse conocimiento acabado de la real prevalencia de esta enfermedad en nuestra población y, en consecuencia, es difícil llevar a cabo planes de prevención o tratamiento sistemático.

Desde unos de los primeros informes en 1916, los casos se han mantenido en aproximadamente 90 al año[1]. En 1985 se produjo un brote en la localidad de Pichanal, Departamento de Orán, en el norte de la provincia de Salta, que posteriormente se extendió a diferentes localidades de la región. Uno de los estudios sobre este brote (NJ Taranto, resultados no publicados) reveló que, de 553 pacientes con clínica compatible con leishmaniasis, las formas encontradas más comunes fueron las úlceras cutáneas, y un porcentaje pequeño mostraba formas mucosas. Al analizarse estos pacientes por IDR, un alto porcentaje (96%) presentó reactividad positiva. El diagnóstico directo a partir del material tomado de las lesiones fue positivo en la mayoría de los casos (84%). En los pocos casos donde pudo hacerse el aislamiento del parásito se demostró que la especie involucrada era *L. (viannia) braziliensis.*

En este estudio, realizado en la misma zona en los años 1992-1993, encontramos también que la mayoría de los casos presentaba lesiones cutáneas y algunos (8%) tenían manifestaciones mucocutáneas. La presencia de afecciones mucosas es un dato importante a tener en cuenta dado que son las que acarrean consecuencias más graves para la salud del paciente.

La IDR de Montenegro es una herramienta importante para el diagnóstico de leishmaniasis cutánea y mucocutánea dada la fuerte reactividad celular observada en estos pacientes. En este estudio, el 100% de los pacientes presentó IDR positiva, pero debe tenerse en cuenta que el criterio de inclusión fue la positividad en esta prueba y/o la visualización del parásito en frotis. Esta última técnica tiene un porcentaje menor de positividad y en nuestro caso no encontramos pacientes con parásitos en las lesiones sin IDR positiva. Creemos que esto no debe interpretarse en el sentido de que la IDR tiene un 100% de positividad porque en este estudio fueron excluidos 7 pacientes con lesiones compatibles con leishmaniasis (úlceras o cicatrices) que dieron negativas ambas pruebas pero que podrían estar infectados por *Leishmania.* Igualmente es importante tener en cuenta que una IDR positiva no necesariamente significa infección activa, ya que puede deberse a una exposición previa curada dado que la reacción puede permanecer positiva por muchos años[21]. Además, el uso de este tipo de preparaciones crudas (suspensiones de promastigotes formolados), puede resultar en una considerable reactividad cruzada con otras especies de tripanosomátidos[22-23].

Se ha destacado el hecho de que el diagnóstico serológico en la leishmaniasis cutánea no es muy confiable dado los bajos títulos de Ac circulantes que implican que cerca del 30% de los casos diagnosticados parasitológicamente no sean detectados por serología[24]. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio muestran que de los 30 pacientes leishmaniásicos sin evidencia de infección por *T. cruzi* (26 con frotis po-

sitivo), 7 presentaban reactividad positiva frente a 3 reacciones con Ag de *Leishmania*, 11 eran positivos frente a dos de ellas y 12 frente a una sola reacción, por lo que el 100% dio positivo al menos una reacción. Esto estaría indicando el desarrollo de una importante respuesta inmune humoral desencadenada por la infección que se manifiesta frente a distintos tipos de antígenos y además, que el análisis serológico puede contribuir al diagnóstico de la enfermedad, complementando a las otras técnicas (frotis e IDR). Merece destacarse que 2 pacientes incluidos en el grupo de los que no presentaban evidencia de infección por *T. cruzi* (ambos con IDR positiva y uno de ellos con frotis positivo) dieron negativas todas las pruebas serológicas tanto para Ag homólogos como heterólogos, a pesar de tener lesiones de un año de evolución.

Las áreas endémicas tanto de leishmaniasis como de enfermedad de Chagas se superponen en muchas zonas del continente americano y también en nuestro país. Este hecho, sumado a la cercana relación antigénica entre los parásitos, dado que pertenecen a la misma familia, trae como consecuencia la posibilidad de un diagnóstico erróneo debido fundamentalmente al uso de mezclas antigénicas complejas en las reacciones serológicas convencionales. Así, en este estudio en el que se analizaron pacientes con evidencias clínicas de leishmaniasis empleando reacciones de rutina para el diagnóstico de enfermedad de Chagas, encontramos altos porcentajes de reactividad en las técnicas de HAI, IFI y ELISA, lo que concuerda con la previamente descripto[25-29]. Resulta imprescindible entonces el uso de reacciones que permitan un diagnóstico diferencial. Con este objetivo, en nuestro laboratorio hemos purificado, a partir de una mezcla compleja de *T. cruzi* y por inmunoafinidad con un anticuerpo monoclonal, el Ag denominado Ag163B6[7], el que sería idéntico a cruzipaína[8]. Este Ag ha demostrado capacidad para distinguir específicamente sueros de pacientes chagásicos crónicos de pacientes con leishmaniasis[7]. Por otro lado demostramos que por la técnica de «immunoblotting», frente a epimastigotes de *T. cruzi*, los pacientes chagásicos crónicos podían diferenciarse a simple vista de los pacientes leishmaniásicos, a pesar de la intensa reactividad cruzada, porque presentaban un patrón de bandas característico[10].

La verdadera utilidad diagnóstica del ELISA con el Ag163B6 y del perfil de bandas característico de chagásico por «immunoblotting» con epimastigotes, fue comprobada en un estudio previo realizado sobre 7 pacientes leishmaniásicos sospechados de padecer una infección concomitante con *T. cruzi* por presentar estas 2 reacciones positivas. La existencia de tripomastigotes de *T. cruzi* en sangre se verificó por xenodiagnóstico en 3 de estos pacientes y considerando que el porcentaje de positividad de esta técnica en pacientes crónicos es inferior al 50%, se puso de manifiesto el valor de las reacciones mencionadas para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas[30].

En este estudio, 32 de los 62 pacientes que presentaban lesiones típicas de leishmaniasis, tenían también evidencia de infección mixta por *T. cruzi*, indicando que más del 50% de los pacientes tenían infección doble. Creemos que este alto porcentaje de chagásicos en esta particular muestra no debe ser extrapolado a la población de la zona en general dadas las particulares condiciones socioeconómicas e higiénicas en las que viven los pacientes que concurrieron a la consulta.

El análisis de los resultados obtenidos por serología convencional para Chagas mostró que de 30 pacientes sin evidencia de infección por *T. cruzi*, 11 eran positivos frente a 2 de las técnicas y 7 eran positivos frente a todas ellas. Por lo tanto, un 60% de los individuos leishmaniásicos podrían ser diagnosticados erróneamente como chagásicos con todas las implicancias que esto tiene desde el punto de vista personal y socioeconómico. Esto refuerza la importancia de contar con Ag definidos y técnicas apropiadas para poder hacer un diagnóstico serológico diferencial, lo que se vuelve primordial en zonas endémicas donde ambas parasitosis pueden ser prevalentes.

Agradecimientos: A las Dras. Estela Lammel y Franke de Cazzulo, por la provisión de los parásitos y al Instituto Nacional de Desarrollo e Investigación de la Enfermedad de Chagas «Dr. Mario Fatala Chaben» por la provisión de antígenos complejos de *T. cruzi*. Estas investigaciones se realizaron con subsidios otorgados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad de Buenos Aires (UBA).

Summary

Human leishmaniasis infection in the Province of Salta. Evidence of mixed infection with Trypanosoma cruzi *and* Leishmania spp.

In many regions of South America there are overlapping endemic areas for American Trypanosomiasis (Chagas' disease) and Leishmaniasis. *T. cruzi* and *Leishmania spp.*, the causative agents of these parasitoses belong to the *Trypanosomatidae* family and share various antigens that cause cross-reactivity in serological diagnosis when complex antigenic mixtures are used.

We studied patients who sought medical attention because of cutaneous or mucocutaneous lesions typical of leishmaniasis infection. These patients were from the province of Salta where Trypanosomiasis and Leishmaniasis are endemic diseases. Sixty-two patients gave a positive Montenegro skin test and, of these, 53 (85,48%) showed the presence of amastigotes in Giemsa stained smears of dermal scrapings. Seven patients were not included because they were negative for both assays.

We analyzed the leishmaniasic sera against homologous antigens to study the immune response and against complex heterologous antigens from *T. cruzi* to evaluate cross-reactivity phenomena. We also tested these sera against specific antigens for diagnosis of Chagas' disease in order to search for mixed infections. When complex antigens from leishmania were used, the sera showed an unusually strong antibody response: 100% positive by IFA, 88.7% by ELISA, and 80.6% by immunoblotting. Furthermore, significant cross-reactivity was found when conventional antigens for the serodiagnosis of Chagas' disease were used: 74.19% by IHA, 91.93% by IFA, and 75.80% by ELISA.

We have previously purified by immunoaffinity, using a monoclonal antibody, an antigen termed Ag163B6 which is not present in *L. mexicana*. This antigen has shown the ability to specifically differentiate sera of chronic chagasic patients from those of leishmaniasic patients in ELISA. Furthermore, recent studies from our laboratory by immunoblotting, have demonstrated that chronic chagasic patients exhibit a specific reactivity pattern against *T. cruzi* epimastigotes that can be distinguished from those presented by leishmaniasic patients in spite of cross-reactive antigens. According to the results obtained in these assays, we classified the patients in two groups: 1) Patients with evidence of *T. cruzi* infection, those who tested positive in at least one assay; 2) Patients with no evidence of *T. cruzi* infection who were negative for both assays. More than 50% (32/62) of the patients showed strong evidence of mixed infection with *T. cruzi*. On the other hand, high cross-reactivity between these two parasitoses was shown in the second group without any evidence of *T. cruzi* infection since 18 out of 30 were positive in at least two conventional serological reactions. This implies that they would be misdiagnosed as chagasics if conventional reactions were used. These results emphasize the importance of the use of defined antigens and appropriate techniques for the differential diagnosis of these parasitoses, which is more important in areas endemic for both of them.

Bibliografía

1. Segura EL, Salomón OD, Sosa Estani S, et al. Control y estado actual de las endemias producidas por protozoarios en Argentina: leishmaniasis y paludismo. VII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, 1995.
2. Salomón D, Gómez A, Sosa S, et al. Leishmaniasis en Argentina: Estudio multidisciplinario en Salta 1990/1992. XII Reunión Anual Sociedad Argentina de Protozoología. Buenos Aires. 1992.
3. World Health Organization. Public Health Aspects. In: WHO, Technical Report Series 701. The leishmaniasis. Geneva; WHO, 1984; 53-60.
4. Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G. IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1990: 43: 650-6.
5. Lemesre JL, Afchain D, Orozco O, et al. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi* specific monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 1986: 35: 86-93.
6. Levy-Yeyati PS, Bonnefoy G, Mirkin G, et al. The 70 kDa heat shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi/Leishmania braziliensis* mixed infection. *Immunol Lett* 1991: 31: 27-34.
7. Carbonetto CH, Malchiodi EL, Chiaramonte M, et al. Isolation of a *Trypanosoma cruzi* antigen by affinity chromatography with a monoclonal antibody. Preliminary evaluation of its possible applications in serological tests. *Clin Exp Immunol* 1990: 82: 93-6.
8. Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Martínez JA, et al. Identity of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* and an antigen (Ag163B6) isolated with a monoclonal antibody. *Immunol Lett* 1993: 35: 59-62.
9. Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*. In: Coombs GH, North MJ, eds. Biochemical Proto-

zoology. London: Taylor & Francis, 1991; 191-9.
10. Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Taranto NJ, et al. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.*: the use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag 163B6). *Clin Exp Immunol* 1994: 97: 417-23.
11. Montenegro J. Cutaneous reaction in leishmaniasis. *Archives in Dermatology and Syphilis* 1926: 13: 187-9.
12. Chiari E, Camargo EP. Culturing and cloning of *T. cruzi*. In: Morel CM, ed. Genes and antigens of parasites. Rio de Janeiro: Fundaçao Oswaldo Cruz, 1984; 23-6.
13. Jaffe CL, Grimaldi G, McMahon-Pratt D. The cultivation and cloning of leishmania. In: C. M. Morel, ed. Genes and antigens of parasites. Rio de Janeiro: Fundaçao Oswaldo Cruz, 1984; 43-91.
14. Bradford MN. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976: 72: 248-54.
15. Fuchs S, Sela M. Immunoadsorbents. In: Weir ED, ed. Handbook of Experimental Immunology (Immunochemistry). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986; 16: 1-6.
16. Alvarez M, Cerisola JA, Rohwedder RW. Test de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol Chile Parasitol* 1968: 23: 4-9.
17. Voller A, Bidwell D, Bartlett A. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: Rose NR, Friedman H, eds. Manual of Clinical Immunology. 2nd edn. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1988; 359-71.
18. Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970: 227: 680-4.
19. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from plolyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979: 76: 4350-4.
20. Binsztein N, Eiman Grossi M. Sistema de vigilancia epidemiológica. *Infect & Microbiol Clin* 1993: 5: 126-9.
21. Guirgues SY. Natural and experimental re-infection of man with oriental sore. *Ann Trop Med Parasitol* 1971: 65: 197-205.
22. Dostrovsky A, Sagher F. The intracutaneous test in cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1946: 40: 265-9.
23. Koufman Z, Egoz N, Greenblatt, CL, et al. Observations on immunization against cutaneous leish-maniasis in Israel. *Israel J Med Sci* 1978: 14: 218-22.
24. El Safi SH, Evans DA. A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the sero-diagnosis of leishmaniasis in the Sudan. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1989: 83: 334-7.
25. Araujo FG. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound to specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. *Inf Immun* 1986: 53: 179-85.
26. Camargo ME, Rebonato C. Cross-reactivity fluorescence tests for *Trypanosoma* and leishmania antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 1969: 18: 500-5.
27. Camargo ME. American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: Balows A, Hausler Jr WJ, Lennette E, (eds). Laboratory diagnosis of infectious diseases, principles and practice. New York: Springer-Verlag, 1988; 744-53.
28. Schattschneider W, Lopes ER, De Alencar JE, et al. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. *Trop Geogr Med*, 1992: 44: 210-8.
29. Soares Guimaraes MC, Celeste BJ, de Castilho EA, et al. ELISA in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar and Chagas' disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-leishmania antibodies. *Am J Trop Med Hyg*, 1981: 30: 942-7.
30. Chiaramonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, et al. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp* human mixed infection. *Am J Trop Med Hyg* 1996: 54: 271-3.

- - -

La Ciencia es un producto de colaboración internacional, al través del tiempo y el espacio. Hay una continuidad vertical al través de las generaciones y una continuidad horizontal entre todos los pueblos contemporáneos. La Ciencia crece así por transmisión, aumento, revisión y perfeccionamiento incesantes.

Bernardo Houssay (1887-1971)

El papel de la Ciencia. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 1950; CL: 197-209.