

INMUNOFLUORESCENCIA CON *CRITHIDIA LUCILIAE* PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI-ADN

## IMAGENES ATIPICAS Y SU RELACION CON ENFERMEDAD DE CHAGAS Y LEISHMANIASIS

GLORIA GRIEMBERG<sup>1</sup>, NIDIA F. FERRAROTTI<sup>1</sup>, GRACIELA SVIBEL<sup>2</sup>, MARIA R. RAVELLI<sup>1</sup>, NESTOR J. TARANTO<sup>3</sup>, EMILIO L. MALCHIODI<sup>4</sup>, MARIA C. PIZZIMENTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires; <sup>2</sup> Laboratorio Central, Hospital Escuela José Francisco de San Martín, Corrientes; <sup>3</sup> Instituto de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Nacional de Salta; <sup>4</sup> Cátedra de Inmunología, (IDEHU, CONICET-UBA). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

**Resumen** Los anticuerpos anti-ADN nativo pueden detectarse por inmunofluorescencia indirecta con *Crithidia luciliae*, observándose tinción fluorescente anular del kinetoplasto que contiene ADN de doble cadena. En algunos casos pueden observarse imágenes fluorescentes en flagelo, membrana y corpúsculo basal, consideradas atípicas. Como *C. luciliae* pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, que incluye patógenos para el hombre como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp., se consideró que las imágenes atípicas pudieran deberse a reacciones cruzadas. Se realizaron estudios serológicos para Chagas a 105 muestras provenientes de zona endémica (Corrientes) y no endémica (Buenos Aires) para *T. cruzi* que presentaban imágenes atípicas con *C. luciliae*. La serología para Chagas resultó positiva en el 64.7% de las muestras de Buenos Aires y en el 78.3% de las de Corrientes que presentaban frente a *C. luciliae* imagen conjunta de membrana y flagelo. No presentaron la imagen conjunta ninguna de las muestras de dadores de sangre normales, ni de pacientes con enfermedades del tejido conectivo, excepto dos con lupus que también eran chagásicos. Todas las muestras de pacientes chagásicos analizadas frente a *C. luciliae* presentaron la imagen conjunta. Se estudiaron también 46 muestras de pacientes con leishmaniasis, 28 de ellos coinfectados con *T. cruzi*. La imagen conjunta se observó en el 88.0% de las muestras de leishmaniásicos y en el 78.5% de las de coinfectados. Los resultados sugieren que *C. luciliae* podría ser un sustrato alternativo, económico y de bajo riesgo para el diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas, aunque no discrimina la infección por *Leishmania*. El hallazgo de la imagen conjunta en la detección de anti-ADN nativo señala la conveniencia de realizar en esos pacientes, estudios clínicos y de laboratorio para enfermedad de Chagas y leishmaniasis.

**Palabras clave:** enfermedad de Chagas, leishmaniasis, *Crithidia luciliae*, anticuerpos anti-ADN

**Abstract** *Immunofluorescence assay with Crithidia luciliae for the detection of anti-DNA antibodies. Atypical images and their relationship with Chagas' disease and leishmaniasis.*

Anti-native DNA antibodies can be detected by indirect immunofluorescence assay with *Crithidia luciliae*, displaying an annular image due to a kinetoplast containing double stranded DNA. Other structures such as membrane, flagellum and basal corpuscle can be stained as well, showing what is called atypical fluorescent images. As *C. luciliae* belongs to the *Trypanosomatidae* family, which include the human pathogens *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp., it was considered that these atypical images could be caused by cross-reactions. Serological studies for Chagas' disease were performed in 105 serum samples displaying atypical images. Sixty four percent of the samples from non endemic and 78.3% from endemic areas for Chagas' disease showed fluorescence in both, membrane and flagellum (joint image). Fifty samples from normal blood donors and 57 samples from patients with connective tissue diseases were tested with *C. luciliae*. None of them presented the joint image except for two patients with lupus who were also chagasic. In addition, 54 samples from chagasic patients were studied and all of them presented the joint image. We also studied 46 samples from patients with leishmaniasis from whom 28 were co-infected with *T. cruzi*. The joint image was observed in 88.0% of the samples with leishmaniasis and in 89.3% of the co-infected samples. The results suggest that *C. luciliae* could be used as an economical, and of low risk, alternative substrate for the serological diagnosis of Chagas' disease, even though it does not discriminate for *Leishmania* spp. infection. This study also suggests that whenever atypical images are observed in *C. luciliae* during the search for anti-DNA antibodies, it would be convenient to submit the patient to clinical and serological tests for the diagnosis of leishmaniasis and Chagas' disease.

**Key words:** Chagas' disease, leishmaniasis, *Crithidia luciliae*, anti-DNA antibodies

Los anticuerpos (Ac) anti-ADN fueron reconocidos por primera vez en el año 1957 en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES)<sup>1</sup>. Básicamente existen dos tipos de Ac, los anti-ADN nativo o de doble cadena (ADNn) y los anti-ADN desnaturalizado, dirigidos contra el ADN de cadena simple. Estos últimos poseen poca especificidad diagnóstica, ya que pueden estar presentes en una amplia variedad de enfermedades del tejido conectivo y en otras enfermedades, inclusive no autoinmunes<sup>2</sup>. En cambio, los Ac anti-ADNn se expresan casi exclusivamente en el LES, por lo cual su presencia constituye uno de los criterios clasificatorios<sup>3,4</sup>, siendo además útiles para pronóstico y monitoreo terapéutico de estos pacientes<sup>5,6</sup>. La gran ventaja práctica de dosar anti-ADNn condujo al desarrollo de numerosas técnicas para su cuantificación, tales como hemaglutinación, radioinmuno-ensayo, enzimo-inmunoensayo e inmunofluorescencia<sup>7,8</sup>.

Uno de los métodos más comunmente utilizados en la práctica clínica es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que utiliza como sustrato antigénico *Crithidia luciliae*, un hemoflagelado que posee una mitocondria gigante modificada, el kinetoplasto, que contiene ADN de doble cadena en una configuración circular, no asociado con ARN ni con proteínas nucleares<sup>9</sup>. *Crithidia luciliae* no es patógena para el hombre y puede mantenerse fácilmente en cultivos, por lo que resulta un sustrato conveniente para la detección de anti-ADNn por IFI, obviando la necesidad de purificar químicamente el ADN. Un resultado serológico positivo se manifiesta por una tinción fluorescente anular del kinetoplasto. Si no se observa fluorescencia del mismo, el resultado se considera negativo.

Sin embargo, en algunas ocasiones puede observarse fluorescencia en otras estructuras del parásito tales como corpúsculo basal, membrana citoplasmática, flagelo y ocasionalmente en citoplasma, ya sea en forma aislada o en distintas combinaciones. Este tipo de imágenes, designadas en este trabajo como atípicas, no se relacionan con la presencia de Ac anti-ADNn.

*Crithidia luciliae* es un parásito de insectos perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, la cual incluye algunas especies patógenas para el hombre tales como *Trypanosoma cruzi*, parásito protozoario que se localiza exclusivamente en el Continente Americano y que es el agente causal de la enfermedad de Chagas y *Leishmania* spp, que genera diferentes formas clínicas de leishmaniasis en el hombre y es endémica en algunas regiones de Latinoamérica incluyendo el noroeste argentino. Teniendo en cuenta estas consideraciones y la existencia de reactividad cruzada entre miembros de esta familia<sup>10,11</sup>, el objetivo de este trabajo fue analizar si las imágenes atípicas que se observan en algunos casos cuando se realiza la detección de Ac anti-ADNn por la técnica de IFI con *C. luciliae*, pueden relacionarse con la presencia de Ac anti-*T. cruzi* o *Leishmania* spp.

## Materiales y métodos

### Muestras séricas

a) Se seleccionaron 105 sueros de pacientes con sospecha de enfermedad autoinmune sistémica y solicitud de anticuerpos anti-ADNn que presentaban imágenes atípicas por IFI con *C. luciliae*. De ellas, 50 correspondieron a pacientes del Hospital de Clínicas José de San Martín de la Ciudad de Buenos Aires y 55 a pacientes del Hospital Escuela José Francisco de San Martín de la Ciudad de Corrientes, Provincia de Corrientes.

b) Se analizaron 57 sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas, distribuidas de la siguiente forma: LES (30), artritis reumatoidea (15) y esclerodermia (12).

c) Se seleccionaron 54 muestras de seroteca de pacientes provenientes de ambos hospitales, con diagnóstico clínico y serológico de enfermedad de Chagas. La serología fue definida como positiva en base a los resultados concordantes de dos métodos distintos, hemaglutinación indirecta (HAI) e IFI con epimastigotes de *T. cruzi*.

d) Como controles negativos para Chagas se utilizaron 50 muestras de dadores de sangre del Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas José de San Martín.

e) Se tomaron 46 muestras séricas de pacientes con diagnóstico de leishmaniasis cutánea o mucocutánea basado en la observación clínica, la proveniencia de área endémica (Orán, H. Irigoyen, Embarcación, Bermejo, Mosconi y Pichanal, Provincia de Salta) y por ser positivos en la intradermorreacción de Montenegro y/o por la presencia de amastigotes de *Leishmania* spp en el raspado de lesiones. El diagnóstico fue complementado con estudios de IFI con promastigotes de *Leishmania braziliensis*. De estas muestras, 28 eran de pacientes que además estaban coinfectados con *T. cruzi*, lo que fue diagnosticado en base a los resultados de las determinaciones de Acs anti-Ag163B6 (específico para *T. cruzi*), por la presencia de un patrón de bandas específico por *immunoblotting* frente a epimastigotes y por presentar PCR positiva con *primers* específicos de *T. cruzi*<sup>12-14</sup>.

### Determinación de Acs anti-ADNn

Se utilizó la técnica de IFI según el método descripto<sup>9</sup> utilizando improntas de *C. luciliae* (*Bio-Rad*, Redmond WA, USA) y conjugado de antiinmunoglobulinas totales humanas obtenidas en burro marcadas con isotiocianato de fluoresceína (*Beckman Coulter*, Fullerton CA, USA).

### Hemaglutinación indirecta para Chagas

Se utilizó el equipo de Polychaco S.A.I.C, Buenos Aires, Argentina, según las indicaciones del fabricante.

### Inmunofluorescencia indirecta para Chagas

Se utilizó una suspensión de epimastigotes provista por el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fátala Chaben. Las improntas se prepararon ajustando la concentración de parásitos a 40 por campo microscópico de 400X y se fijaron por calor. La dilución inicial del suero fue de 1/30 en PBS y para la tinción fluorescente se utilizó un conjugado de anti-Ig totales humanas obtenidas en burro, marcadas con isotiocianato de fluoresceína. (*Beckman Coulter*, Fullerton CA, USA).

## Resultados

La imagen característica de la presencia de Acs anti-ADNn se caracteriza por una tinción fluorescente anular

del kinetoplasto de *C. luciliae*. La aparición de fluorescencia en otras estructuras del parásito, tales como membrana, flagelo, citoplasma o corpúsculo basal no es indicativa de la presencia de Acs anti-ADNn y debe ser considerada como una imagen atípica. La imagen atípica caracterizada por fluorescencia de membrana y de flagelo se define en este trabajo como imagen conjunta (Fig. 1).

A las 105 muestras séricas con solicitud de Ac anti-ADNn que presentaron imágenes atípicas con *C. luciliae* se les efectuaron estudios serológicos para Chagas (HAI e IFI con epimastigotes de *T. cruzi*). Se consideró que la serología para Chagas era positiva cuando una muestra presentaba resultados positivos concordantes por ambas técnicas. En la Tabla 1 se presentan los resultados de las 50 muestras del Hospital de Clínicas de Buenos Aires donde se puede ver que de las 17 muestras que presentaban fluorescencia conjunta en membrana y flagelo de *C. luciliae*, 11 (64.7%) eran también positivas para *T. cruzi*. Por el contrario, ninguna de las muestras que presentaban fluorescencia únicamente en membrana o en corpúsculo basal fue positiva en los ensayos serológicos para enfermedad de Chagas.

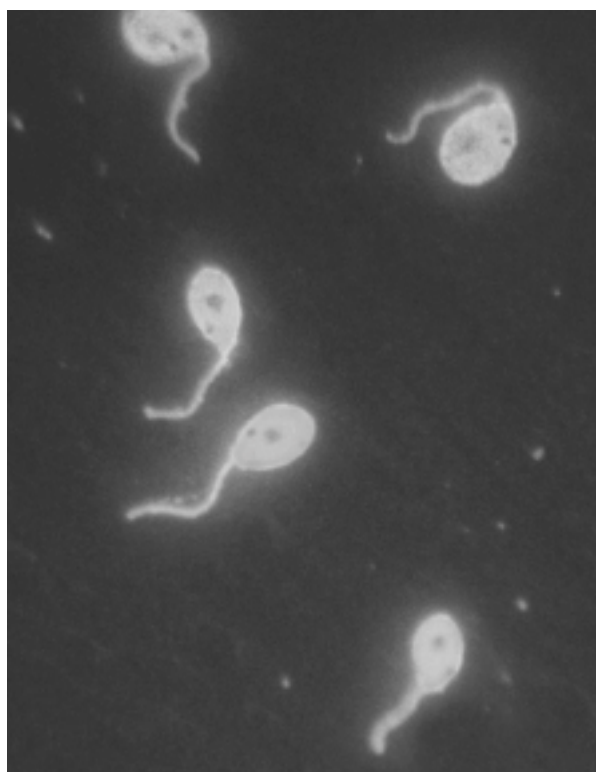


Fig. 1.— Inmunofluorescencia con *Crithidia luciliae* realizada con una muestra sérica de paciente chagásico. Se observa una imagen atípica caracterizada por fluorescencia conjunta de membrana y flagelo. El tono grisáceo del citoplasma corresponde a la tinción con el contracolor (Azul de Evans, 1000X).

En la Tabla 2 se pueden observar los resultados obtenidos con las 55 muestras con imágenes atípicas provenientes de una zona endémica de Argentina, la Ciudad de Corrientes. De las 23 muestras que presentaban fluorescencia conjunta en membrana y flagelo de *C. luciliae*, 18 (78.3%) eran también positivas para *T. cruzi*. Nuevamente, de las muestras que presentaban fluorescencia en membrana o en corpúsculo basal únicamente, ninguna fue positiva en los ensayos serológicos para enfermedad de Chagas.

El estudio con *C. luciliae* por IFI de los 57 sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas mostró que 42 sólo presentaban tinción del corpúsculo basal, 13 no mostraron fluorescencia alguna y 2 pacientes con lupus presentaron una imagen anular característica de Ac anti-ADNn y una imagen atípica caracterizada por la tinción conjunta de membrana y flagelo. Al estudiar las muestras por los métodos HAI e IFI para Chagas, todas presentaron resultados negativos excepto las dos que poseían la imagen conjunta.

Los 50 sueros de pacientes con diagnóstico clínico y serológico de enfermedad de Chagas de los dos hospitales presentaron fluorescencia conjunta en flagelo y membrana al ser analizados con *C. luciliae*.

Ninguna de las 50 muestras de donadores de sangre con serología negativa para Chagas presentó la imagen

TABLA 1.— Serología para el diagnóstico de enfermedad de Chagas en 50 muestras de zona no endémica con imágenes atípicas en la IFI con *Crithidia luciliae*

Imágenes atípicas (n = 50)	Serología de Chagas n (%)	
	Positiva	Negativa
Membrana y flagelo* (n = 17)	11 (64.7)	6 (35.3)
Membrana (n = 1)	0 (0)	1 (100)
Corpúsculo basal (n = 32)	0 (0)	32 (100)

\*Con o sin fluorescencia del corpúsculo basal

TABLA 2.— Serología para el diagnóstico de enfermedad de Chagas en 55 muestras de zona endémica que presentaban imágenes atípicas por IFI con *C. luciliae*

Imágenes atípicas (n = 50)	Serología de Chagas n (%)	
	Positiva	Negativa
Membrana y flagelo* (n = 23)	18 (78.3)	5 (21.7)
Membrana (n = 1)	0 (0)	1 (100)
Corpúsculo basal (n = 31)	0 (0)	31 (100)

\*Con o sin fluorescencia del corpúsculo basal

TABLA 3.- *Imágenes atípicas obtenidas por IFI con C. luciliae en muestras de pacientes con leishmaniasis y en pacientes con leishmaniasis y enfermedad de Chagas*

Imágenes fluorescentes	Leishmaniasis	Leishmaniasis y enfermedad de Chagas
	n = 28	n = 18
Membrana y flagelo*	16 (88.8%)	22 (78.5%)
Membrana	0 (0.0%)	2 (7.1%)
Corpúsculo basal	0 (0.0%)	1 (3.6%)
Ausencia de fluorescencia	2 (11.2%)	3 (10.7%)

\*Con o sin fluorescencia del corpúsculo basal

conjunta al ser analizadas por IFI con *C. luciliae*. Sólo 3 mostraron una imagen atípica caracterizada exclusivamente por fluorescencia del corpúsculo basal, mientras que en las 47 muestras restantes no se observó ninguna imagen fluorescente.

Se estudiaron también 46 muestras de pacientes provenientes de zona endémica para leishmaniasis y tripanosomiasis (Salta, Argentina). Los pacientes habían consultado por lesiones cutáneas o mucocutáneas compatibles con leishmaniasis, y el diagnóstico de esta enfermedad se llevó a cabo ya fuera por observación directa de amastigotes en raspados de la lesión o por reacción positiva a la intradermorreacción de Montenegro. Los sueros fueron también estudiados empleando reacciones serológicas convencionales para el diagnóstico de enfermedad de Chagas, obteniéndose resultados positivos en la mayoría de los casos. Empleando las técnicas de *immunoblotting*, ELISA con el Ag163B6/cruzipaina y PCR, todos ellos específicos para *T. cruzi*, se diagnosticó una infección concomitante con *T. cruzi* en 28 de los pacientes leishmaniásicos. En la Tabla 3 puede observarse que el 88.8% de los 18 pacientes infectados únicamente con *Leishmania* presentó la imagen atípica de fluorescencia conjunta. El 11.2% restante no mostró imágenes fluorescentes con *C. luciliae*. De los 28 pacientes coinfectados con *T. cruzi*, 78.5% presentó la imagen conjunta, 7.1% imagen de membrana únicamente, 3.6% imagen de corpúsculo basal, mientras que 10.7% no presentó imagen fluorescente.

## Discusión

Las ideas iniciales para este trabajo surgieron a propósito de un paciente con cardiopatía proveniente de la provincia de Santiago del Estero, una zona endémica para Chagas, que se encontraba internado en el Hospital de Clínicas sin un diagnóstico preciso pero con sospecha de enfermedad autoinmune, presumiblemente LES. Aun-

que los estudios inmunológicos destinados al diagnóstico de colagenopatías fueron negativos, llamó la atención que al realizar la búsqueda de Ac anti-ADNn por IFI con *C. luciliae*, si bien el kinetoplasto no presentaba fluorescencia, se observaba una coloración atípica caracterizada por una intensa fluorescencia conjunta de membrana, flagelo y corpúsculo basal. Estas imágenes fluorescentes son similares a la que se observa en IFI para Chagas con epimastigotes de *T. cruzi*. Por otra parte, teniendo en cuenta que *C. luciliae* pertenece a la familia *Trypanosomatidae* (dentro de la cual se encuentran otros parásitos patógenos para el hombre, como *T. cruzi* y *Leishmania* spp), que existen reacciones cruzadas entre miembros de la misma familia<sup>10</sup> y que el paciente provenía de zona endémica para Chagas, se consideró que estas imágenes podrían ser debidas a la presencia de Ac anti-*T. cruzi*, lo cual fue confirmado serológicamente.

Con el objeto de comprobar si esto era un fenómeno aislado o una reactividad cruzada que se presentaba regularmente, se realizaron los ensayos destinados a la detección de enfermedad de Chagas en muestras de pacientes que mostraban imágenes atípicas utilizando las técnicas de HAI e IFI. Estos estudios se realizaron en paralelo en el Hospital de Clínicas de Buenos Aires y en el Hospital Escuela de Corrientes, porque existen diferencias en la prevalencia de la enfermedad en las dos zonas, con el objeto de estudiar si esto se reflejaba en los ensayos con *C. luciliae*. En las Tablas 1 y 2 se observa que la única imagen asociada con infección por *T. cruzi* es la que reúne la tinción conjunta de membrana y flagelo, mientras que las imágenes aisladas no se correlacionaron con serología positiva para Chagas. Los dos sueros que presentaron además fluorescencia citoplasmática se relacionaban con un mayor título de Acs anti-*T. cruzi* (resultados no mostrados).

Comparando las Tablas 1 y 2 puede observarse que se registró un porcentaje mayor de casos asociados con enfermedad de Chagas en Corrientes, lo cual no es sorprendente dada la mayor prevalencia en zona endémica. Esta diferencia de prevalencia hallada por métodos serológicos utilizando antígenos de epimastigotes de *T. cruzi* también se observó al utilizar como antígeno *C. luciliae*.

Debe considerarse que en las enfermedades autoinmunes sistémicas se producen autoanticuerpos dirigidos contra antígenos celulares que poseen la propiedad de cruzar la barrera de especie. Podría suponerse que estos autoanticuerpos presentarían reacción cruzada tanto frente a antígenos de *C. luciliae* como a los de *T. cruzi*. Sin embargo, los resultados obtenidos con las 57 muestras de pacientes con enfermedades del tejido conectivo muestran que los autoanticuerpos no fueron causa de falsos resultados positivos por cruzamiento. Es de señalar que las dos pacientes con LES que presentaron la

imagen conjunta y positividad en las pruebas serológicas para enfermedad de Chagas provenían de zona endémica y sus antecedentes mostraron un diagnóstico positivo para la misma.

Dado que existen antígenos comunes entre el *T. cruzi* y tripanosomatídeos propios de insectos<sup>11</sup>, se consideró la posible utilización de la *C. luciliae* como fuente alternativa, económica y de bajo riesgo, para la detección de Ac anti-*T. cruzi*. Para ello, se realizó un estudio por IFI con *C. luciliae* con las 54 muestras de pacientes chagásicos y con los controles negativos provenientes de banco de sangre, hallándose una completa concordancia con respecto a los resultados obtenidos utilizando epimastigotes de *T. cruzi*. Otros autores<sup>11</sup> ya incursionaron en este terreno utilizando como fuente alternativa de antígenos para el diagnóstico de Chagas por IFI los siguientes tripanosomatídeos de insectos: *Herpetomonas muscarum muscarum*, *Crithidia fasciculata* y *Leptomonas seymouri*. Analizaron 151 muestras de pacientes chagásicos y 349 sueros normales. Con *H. m. muscarum* obtuvieron un 98.7% de resultados coincidentes positivos y 100% de resultados coincidentes negativos, mientras que *C. fasciculata* y *L. seymouri* no fueron tan eficientes como fuente alternativa de antígeno para IFI Chagas. Sin embargo, estos autores no analizaron dichas muestras con *C. luciliae*.

Posteriormente, Monteón y col.<sup>15</sup> desarrollaron un método de ELISA y un *Western blot* con un extracto crudo de *C. luciliae*, pero no utilizaron IFI. Aplicaron estas técnicas a 91 muestras de pacientes chagásicos y a 127 muestras de un grupo comparativo constituido por pacientes con toxoplasmosis, leishmaniasis, enfermedad reumática sistémica y enfermedad cardíaca. El ELISA fue siempre positivo con los sueros chagásicos mientras que el 17% del grupo comparativo presentaba resultados falsos positivos. Estos correspondieron a pacientes con leishmaniasis cutánea o visceral. Por *Western blot* los sueros chagásicos reconocían una banda inmunodominante de 30 kDa, mientras que en el grupo comparativo unas pocas muestras de pacientes con leishmaniasis visceral mostraron una débil reacción. Estos autores incluyeron dentro del grupo control muestras de pacientes con leishmaniasis cutánea y visceral, responsables de los resultados falsos positivos, lo cual se explica por las reacciones cruzadas al ser parásitos de la misma familia.

La leishmaniasis, al igual que la enfermedad de Chagas, es endémica en diversas zonas de Latinoamérica y la distribución geográfica de ambas se superpone en muchas áreas de América Central y del Sur, incluyendo el norte de Argentina<sup>14, 16</sup>. Los antígenos utilizados en los estudios serológicos para Chagas y *Leishmania* muestran reactividad cruzada, por lo tanto no es posible diferenciar estas infecciones mediante las técnicas serológicas de uso habitual en el laboratorio clínico. Esta con-

dición puede conducir a errores diagnósticos, distorsión de los datos epidemiológicos y a tratamientos equivocados, especialmente en áreas donde ambas parasitosis coexisten<sup>12</sup>. Con el objeto de analizar la posible utilización de *C. luciliae* para diferenciar serológicamente estas parasitosis, se estudiaron por IFI con *C. luciliae* muestras de 46 pacientes con leishmaniasis, de los cuales 28 estaban coinfectados con *T. cruzi*. En la Tabla 3 se observa que tanto la leishmaniasis, como única infección, como la coinfección con *T. cruzi*, se asocian con la imagen conjunta con la excepción de 2 casos de leishmaniasis y 6 de coinfección. Debe notarse que todas estas muestras presentaban reactividad por IFI con *L. braziliensis* y 3 de las muestras de pacientes coinfectados además eran reactivas por IFI con epimastigotes de *T. cruzi*. Considerando la existencia de reactividad cruzada entre los tripanosomatídeos, llama la atención esta discordancia no observada para los casos de Chagas analizados en este trabajo ni en los obtenidos por otros investigadores<sup>11, 14</sup>. Aunque es necesario realizar un estudio con un mayor número de muestras sobre esto en particular, los resultados obtenidos sugieren que existe una diferencia en las reactividades antigénicas entre *Leishmania spp* o *Leishmania spp.-T. cruzi* y *C. luciliae*.

Los resultados presentados en este trabajo indicarían que *C. luciliae* podría ser un sustrato apto para su uso en el diagnóstico serológico por IFI de la enfermedad de Chagas. De esta manera se evitaría el riesgo que implica la alta infectividad de *T. cruzi* y la complejidad de su cultivo. Del estudio realizado se desprende que no es posible discriminar por este método entre infección por *T. cruzi* y *Leishmania spp* debido a la reactividad cruzada entre los parásitos.

Un aporte interesante de este trabajo al laboratorio bioquímico clínico es que cuando se realiza la búsqueda de Ac anti-ADNn mediante el método de IFI con *C. luciliae* y se encuentra la imagen conjunta característica de membrana y flagelo, es conveniente la realización de estudios clínicos y serológicos para enfermedad de Chagas y leishmaniasis, tanto en pacientes de área endémica como en áreas no endémicas, donde estas enfermedades son sospechadas en menor medida.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado por el subsidio B016 de la Universidad de Buenos Aires.

E.L.M. recibe aportes financieros de la UBA, CONICET y Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

## Bibliografía

1. Ceppellini R, Polli E, Celada F. A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffuse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 96: 572-4.
2. Smeenk RJT, Berden JHM, Swaak AJ. dsDNA autoantibodies. In: Peter JB, Shoenfeld Y (eds). *Autoantibodies*, 1<sup>st</sup> ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1996, p 227-34.

3. Tan N, Cohen AS, Fries JF, et al. Special article. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 1271-7.
4. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 9: 1725.
5. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; 44: 93-151.
6. Swaak AJ, Aarden LA, Staius van Eps LW, Feltkamp TE. Anti-dsDNA and complement profiles as prognostic guides in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979; 22: 226-35.
7. Aarden LA, Lakmaker F, de Groot ER, Swaak AJ, Feltkamp TE. Detection of antibodies to DNA by radioimmunoassay and immunofluorescence. *Scand J Rheumatol. Suppl* 1975; 11: 12-9.
8. Rubin RL, Jolin FG, Tan EM. An improved ELISA for anti-nature DNA by elimination of interference by anti-histone antibodies. *J Immunol Methods* 1983; 63: 359-66.
9. Ballou SP. *Crithidia luciliae* immunofluorescent test for antibodies to DNA. In: Rose NR, Conway de Macario E, Fahey JL, Friedman H, Penn GM. (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 4th ed. Washington D.C: American Society for Microbiology, 1992, p 730-4.
10. Malchiodi EL, Chiaramonte MG, Taranto NJ, Zwirner NW, Margni RA. Cross-reactivity studies and diferencial 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. Lopes JD, Caulada Z, Barbari CL, Plessmann Camargo E. Cross-reactivity between *Trypanosoma cruzi* and insect trypanosomatids as a basis for the diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 1981; 30: 1183-8.
12. Chiaramonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Taranto NJ, Malchiodi EL. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*. human mixed infection. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 54: 271-3.
13. Chiaramonte MG, Frank FM, Furer GM, Taranto NJ, Margni RA, Malchiodi EL. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in leishmaniasis patients. *Acta Tropica* 1999; 72: 295-308.
14. Frank FM, Fernández MM, Taranto NJ, et al. Characterization of human infection by *Leishmania spp*. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitology* 2003; 126: 31-9.
15. Monteón VM, Guzmán-Rojas L, Negrete-García C, Rosales-Encina JL, Reyes López PA. Serodiagnosis of American Trypanosomosis by using non pathogenic trypanosomatid antigen. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3316-9.
16. Chiaramonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Heredia V, Taranto NJ, Malchiodi EL. Human leishmaniasis infection in the province of Salta. Evidence of mixed infection with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp*. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 259-68.

-----

Unos quinientos años antes de la era cristiana se dio en la magna Grecia la mejor cosa que registra la historia universal: el descubrimiento del diálogo. La fe, la certidumbre, los dogmas, los anatemas, las plegarias, las prohibiciones, las órdenes, los tabúes, las tiranías, las guerras y las glorias abrumbaban el orbe; algunos griegos contrajeron, nunca sabremos cómo, la singular costumbre de conversar. Dudaron, persuadieron, disintieron, cambiaron de opinión, aplazaron. Acaso los ayudó su mitología, que era, como el Shinto, un conjunto de fábulas imprecisas y de cosmogonías variables. Estas dispersas conjeturas fueron la primera raíz de lo que llamamos hoy, no sin pompa, la metafísica. Sin esos pocos griegos conversadores la cultura occidental es inconcebible. Remoto en el espacio y en el tiempo, este volumen es un eco apagado de esas charlas antiguas [ . . ]

Jorge Luis Borges (1899-1986)

*En diálogo II.* J.L. Borges, O. Ferrari. Buenos Aires: Editorial Sudamericana, 1986, (Prólogo)