

Patrones diferenciales entre *Leishmaniasis* y chagas, empleando epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Differential patterns between *leishmaniasis* and chagas disease using *Trypanosoma cruzi* epimastigotes

N. Marisol Córdova R.¹, Jhoana Zurita T.², Miguel Guzmán-R.¹, Aleida Verduguez-O.¹, Ernesto Rojas C.¹

Resumen

En diferentes regiones de Latinoamérica la infección por *T. cruzi* y *Leishmania* se superponen, por lo cual se reportan infecciones mixtas circulantes, debido a esto; deben realizarse pruebas diagnósticas específicas para evitar reacciones cruzadas entre estas dos patologías. **Objetivo:** determinar patrones de fluorescencia que permitan la diferenciación entre Leishmaniasis, enfermedad de Chagas e infección mixta empleando epimastigotes de *T. cruzi*. **Métodos:** se empleó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta utilizando epimastigotes de *T. cruzi* (TcV autóctono) como antígeno figurado frente a un panel de muestras de suero codificados como A, B, C y D correspondientes a pacientes con infección por: Leishmaniasis (A), Infección mixta por Leishmania y Chagas(B), Enfermedad de Chagas (C) y sin ninguna de las dos infecciones (D). **Resultados:** en los cuatro paneles de muestras se observaron diferentes patrones de intensidad de fluorescencia a nivel de membrana y núcleo de los epimastigotes de *T. cruzi* (TcV autóctono). **Conclusiones:** la técnica de Inmunofluorescencia (IFI) con antígenos de epimastigotes de *T. cruzi* a demostrado utilidad en la diferenciación entre enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y/o infecciones mixtas por ambos parásitos en aquellas zonas donde la coexistencia de ambas es habitual

Palabras clave: leishmaniasis, chagas, *Trypanosoma cruzi*, epimastigotes, Técnica del Anticuerpo Fluorescente Indirecta.

Abstract

In different regions of Latin America, infection by *T. cruzi* and *Leishmania* overlap, for which mixed circulating infections are reported, due to this; Specific diagnostic tests must be performed to avoid cross reactions between these two pathologies. **Objective:** to determine fluorescence patterns that allow the differentiation between Leishmaniasis, Chagas disease and mixed infection using *T. cruzi* epimastigotes. **Methods:** the Indirect Immunofluorescence technique was used using epimastigotes of *T. cruzi* (autochthonous TcV) as figurative antigen against a panel of serum samples coded as A, B, C and D corresponding to patients with infection by: Leishmaniasis (A), Mixed infection by Leishmania and Chagas (B), Chagas disease (C) and without either of the two infections (D). **Results:** in the four sample panels, different patterns of fluorescence intensity were observed at the membrane and nucleus level of the epimastigotes of *T. cruzi* (autochthonous TcV). **Conclusions:** the Immunofluorescence technique (IFI) with *T. cruzi* epimastigote antigens has proven useful in differentiating between Chagas disease, Leishmaniasis and / or mixed infections by both parasites in areas where the coexistence of both is common.

Keywords: leishmaniasis, chagas, *Trypanosoma cruzi*, epimastigotes, Fluorescent Antibody Technique, Indirect.

La enfermedad de Chagas, también llamada *Tripanosomiasis* Americana, es una enfermedad causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*¹. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que existe entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad de Chagas, en 21 países del continente americano; por lo que aproximadamente el 13% de la población Latinoamericana, estaría en riesgo de contraer la enfermedad². Bolivia, dentro este contexto sufre una de las tasas de infección más altas de casos de enfermedad de Chagas con una seroprevalencia superior al 50%³. Esta enfermedad, estaba establecida casi exclusivamente en áreas rurales. Actualmente las migraciones poblacionales, no solo desde

zonas rurales sino también los movimientos poblacionales a través de los diferentes continentes, hacen que sobrevenga un cambio en el perfil epidemiológico de la enfermedad de Chagas⁴⁻⁶.

La Organización Mundial de la Salud respecto a la Leishmaniasis indica, que hay cerca de 1 500 000 personas afectadas por las diversas formas de Leishmaniasis en todo el mundo. Se considera que, alrededor de 350 millones de personas están en riesgo de infectarse y enfermarse cada año⁷⁻⁹. En Bolivia la Leishmaniasis es menos frecuente que la enfermedad de Chagas, sin embargo, esta enfermedad afecta a personas en cinco de los nueve departamentos que tiene Bolivia¹⁰.

En diferentes regiones de Latinoamérica la infección por *T. cruzi* y *Leishmania*, se superponen¹⁰⁻¹². Es el caso de algunas regiones del Brasil, los Yungas en Bolivia y el norte Argentino, en las cuales se superponen ambas infecciones^{10,14}. Reportes previos, indican la existencia de infecciones mixtas circulantes, tanto en reservorios como en humanos, con presencia de nichos ecológicos sobrepuestos de *T. cruzi* y *Leishmanias*^{12,13}, ocasionando el desarrollo de infecciones mixtas, razón por

¹CUMETROP- IIBISMED, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. <https://orcid.org/0000-0002-4406-8053>, <https://orcid.org/0000-0001-9753-5885>, <https://orcid.org/0000-0001-7896-9952>, <https://orcid.org/0000-0002-8959-9624>.

²Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón. <https://orcid.org/0000-0002-2156-1208>

*Correspondencia a: N. Marisol Córdova R.
Correo electrónico: nmarcordova@yahoo.com
Recibido el 10 de julio de 2020. Aceptado el 01 de octubre de 2020.

la cual se debe aplicar con prudencia pruebas diagnósticas convencionales ya que pueden presentar reacciones cruzadas¹⁴. De ahí la importancia de realizar diferentes pruebas serológicas como ELISA, HAI e IFI específicas para el diagnóstico de la fase crónica de la enfermedad de Chagas y el frotis y/o cultivo para el diagnóstico de Leishmaniasis tegumentaria americana¹⁵.

Usualmente, para el diagnóstico serológico de la Leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, se empleaba la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Técnica de costo relativamente bajo debido a que el sustrato antigénico puede ser preparado en cualquier laboratorio de mediana complejidad¹⁶, además, dicha técnica es de muy buena sensibilidad y especificidad diagnóstica, especialmente para la enfermedad de Chagas¹⁷. Sin embargo, actualmente el empleo de esta técnica serológica para el diagnóstico de la Leishmaniasis queda en duda, ya que expertos no recomiendan el uso de del IFI cuando la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis coexisten^{15,18}, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales por las posibles reacciones cruzadas entre ambas patologías a títulos bajos, debido a que los agentes etiológicos de estas dos enfermedades poseen una ascendencia común muy cercana^{19,20}, por lo tanto, es de esperar que compartan una significativa cantidad de características antigénicas. Por ello, pacientes con alguna de las dos infecciones o con infección mixta pueden resultar mal diagnosticadas, debido a reacciones serológicas cruzadas cuando se usan mezclas de antígenos no caracterizados^{21,22}.

Ante la necesidad de diferenciar entre estas dos patologías en una región tropical del departamento de Cochabamba, donde cohabitan ambas patologías, debido a los flujos migratorios poblacionales durante los últimos años, desde zonas endémicas para Chagas a regiones tropicales endémicas para Leishmaniasis, se realiza este estudio descriptivo, con el fin de determinar el diagnóstico diferencial de la Leishmaniasis, enfermedad de Chagas e Infección mixta empleando epimastigotes de *T. cruzi* (TcV autóctono) siguiendo la técnica de Luis Vásquez Huerta y col.¹⁶.

Material y métodos

Se estudiaron 97 muestras de sueros sanguíneos pertenecientes a personas con ausencia de infección por Chagas y/o Leishmaniasis y personas infectadas por *T. cruzi* y *Leishmania spp*, dispuestos de la siguiente manera: Muestras de suero de pacientes con Infección por *Leishmania spp* (n=23), Muestras de suero de pacientes con Infección mixta por *Leishmania spp* y *T. cruzi* (n=11), Muestras con Infección por *T. cruzi* (n= 30) y Muestras de suero de pacientes sin evidencias de ambas infecciones (n= 33). Dichos paneles, fueron preparados a partir de muestras recolectadas en el laboratorio de inmunología del servicio LABIMED y el laboratorio del hospital San Francisco de Asís del municipio de Villa Tunari.

Los paneles de sueros fueron organizados en cuatro grupos (A, B, C, D), resumidas en la tabla 1, haciendo un total de 97 muestras obtenidas.

Procedimientos analíticos

a. Obtención de epimastigotes de *T. cruzi*

Los parásitos de *Trypanosoma cruzi* (TcV) en su forma de epimastigotes fueron donados por la Dra. MC Torrico, los cuales fueron obtenidos a partir de cultivos en el laboratorio de Parasitología del servicio LABIMED, Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón.

b. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Para la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), se empleó un control positivo y control negativo. Como antígeno se utilizó epimastigotes de *Trypanosomas* obtenidos de cultivos (Donación), los cuales fueron fijados en láminas y conservados en el congelador. Sobre éstas láminas, se realizó la reacción antígeno-anticuerpo.

En una placa de microtitulación se realizó las diluciones 1/16, 1/32 y 1/64 de cada suero a evaluar y de los controles. Estos una vez homogenizados se dispensaron en el área del círculo correspondiente a la lámina. Una vez incubada la placa, realizado el lavado con PBS-Tween y posterior secado, se agregó 15 uL del conjugado Anti IgG humano marcado con fluoresceína (Biomérieux), se incubó por 30 minutos, se volvió a lavar las láminas y se las dejó secar para realizar las lecturas.

c. Observación por microscopía de inmunofluorescencia

Durante la observación de las muestras, se puso énfasis en la intensidad, presencia y ausencia de fluorescencia en la superficie y núcleo de los epimastigotes.

Las lecturas se registraron como: Positivo para Chagas(+). Cuando la superficie o los bordes de los parásitos fluorescieron de un color verde manzana intenso. Positivo para Leishmania. Se registró, cuando el núcleo de los parásitos fluorescieron de un color verde manzana intenso, de acuerdo con la ref¹⁶.

Mixto Cuando la superficie y el núcleo fluorescieron de color verde intenso y Negativo (-) Si los parásitos se observan opacos y oscuros Indeterminado (I) Si se observa una débil fluorescencia no homogénea ya sea en la superficie o núcleo de los parásitos.

d. Técnica de HAI para Chagas

Para la Hemaglutinación Indirecta se empleó el kit HAI Chagas Polychaco que emplea glóbulos rojos de carnero. La dilución con la que se inició el procedimiento fue 1/8, para lo cual en una placa de microtitulación, se colocó a los primeros pocillos 70 µL del diluyente de sueros y 25 µL de diluyente a los segundos, terceros y cuartos pocillos. A los primeros pocillos, se colocó también 10 µL de los sueros a evaluar, además los sueros control positivo y negativo. Se realizó diluciones sucesivas transfiriendo 25 uL de los sueros a evaluar, desde la dilución 1/8 hasta el 1/64, desechando los últimos 25uL. Posteriormente se agregó 25uL de la suspensión antigénica a cada pocillo. Se agitó y se dejó en reposo la placa por 60 minutos hasta realizar las lecturas.

Tabla 1. Características de los paneles de suero sanguíneo según los exámenes de laboratorio realizados

Panel de muestras	Exámenes de laboratorio		Interpretación
	Tipo de examen	Resultado	
Panel A (n=23)	E.P.D	Positivo	Infección por Leishmania spp
	Cultivo Diagnóstico	Positivo	
	H.A.I	Negativo	
	I.F.I	Negativo	
	ELISA	⊖	
Panel B (n=11)	E.P.D	Positivo	Infección mixta por Leishmania spp y T. Cruzi
	Cultivo Diagnóstico	Positivo	
	H.A.I	Positivo	
	I.F.I	Positivo	
	ELISA	Positivo	
Panel C (n=30)	E.P.D	⊖	Infección por T. cruzi
	Cultivo Diagnóstico	⊖	
	H.A.I	Positivo	
	IF.I	Positivo	
	ELISA	Positivo	
Panel D (n=33)	E.P.D	⊖	Libre de las dos infecciones
	Cultivo Diagnóstico	⊖	
	H.A.I	Negativo	
	I.F.I	Negativo	
	E.P.D	Negativo	

EPD= Examen parasitológico directo; HAI= hemoaglutinación indirecta para Chagas;
IFI= Inmunofluorescencia indirecta para Chagas; ELISA= Inmunoensayo ligado a enzimas para Chagas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante Distribuciones de Frecuencias.

Consideraciones éticas

Se obtuvo la autorización de los pacientes para la obtención

de muestras de sangre para fines de este estudio, en ambos laboratorios.

Resultados

Los paneles de suero sanguíneos (Tabla 1), representan a sujetos con características diagnósticas definidas.

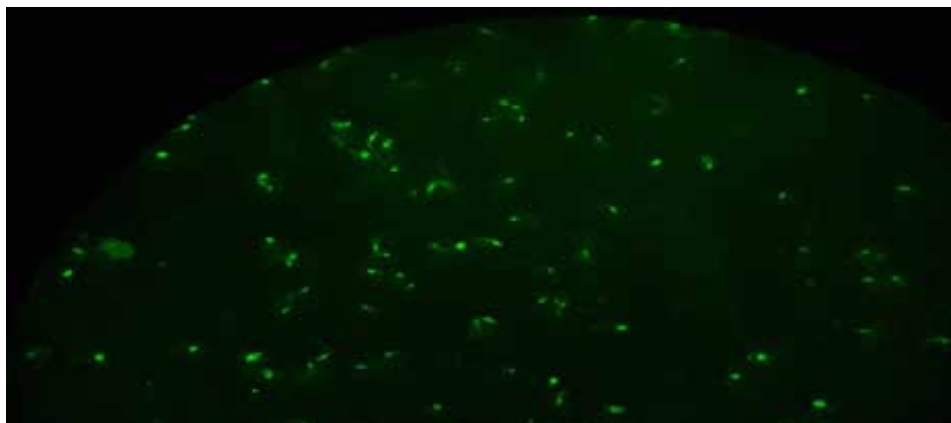


Figura 1. Patrón de fluorescencia de núcleo otorgan a los epimastigotes de *T. cruzi* empleados como antígeno figurado, una intensidad de fluorescencia marcada que se aprecian como pequeñas bombillas con iluminación de color verde fluorescente central e irradiación hacia la periferia. El patrón de fluorescencia nuclear corresponde a muestras de personas identificadas como infección por *Leishmania* spp (panel A).

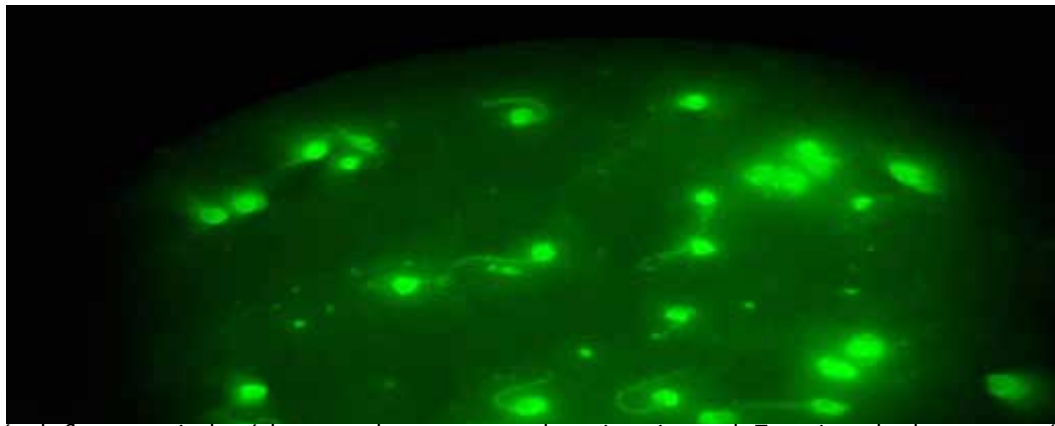


Figura 2. Patrón de fluorescencia de núcleo y membrana otorgan a los epimastigotes de *T. cruzi* empleados como antígeno figurado, una intensidad de fluorescencia marcada que se aprecian como pequeñas bombillas con iluminación de color verde fluorescente. El patrón de fluorescencia núcleo/membrana corresponde a muestras de personas identificadas como coinfección por *Leishmania spp* y *Trypanosoma cruzi*. (Panel B).

Las muestras incluidas en el panel A, correspondientes a 23 personas, se identificaron como infección por *Leishmania spp* en base a los resultados de diagnóstico clínico y por laboratorio. Las muestras del panel B, pertenecían a 11 personas que presentaban infección mixta por *Leishmania spp* y *T. cruzi*, según los resultados de laboratorio de diagnóstico realizados. Así mismo las muestras incluidas en el panel C correspondían a 30 personas con infección por *Trypanosoma cruzi*. Finalmente, las muestras del panel D pertenecían a 33 personas sin evidencias de ninguna de las infecciones indicadas.

La observación microscópica de la reacción entre los epimastigotes de *T. cruzi* empleados como antígeno figurado para la técnica de microscopia de inmunofluorescencia con las muestras de suero del Panel “A”, correspondientes a personas con infección por *Leishmania spp* (Figura 1 y Tabla 2), evidencia la presencia de un patrón de fluorescencia nuclear exclusivamente que se visualiza como fluorescencia interna que se irradia hacia la periferia.

El panel “B” correspondientes a individuos identificados con infección mixta por *Leishmania spp* y *T. cruzi*, en la

observación por microscopia de fluorescencia, presentaron un patrón de fluorescencia nuclear y de membrana con diferente grado de intensidad (Figura 2 y Tabla 2).

El comportamiento de las muestras del panel “C”, proveniente de individuos identificados como infección por *T. cruzi*, presentaron un patrón de fluorescencia de membrana exclusivamente con intensidad de tres cruces mayoritariamente (Figura 3 y Tabla 2).

Del panel “D”, un 24% de las muestras presentaron fluorescencia nuclear, los cuales corresponden a individuos sin ninguna de las dos infecciones estudiadas y con residencia permanente en el área tropical. (Tabla 2).

Al análisis de las muestras que no presentaban ninguna evidencia de infecciones por *T. cruzi* ni *Leishmania spp*, agrupadas según correspondía a personas residentes en el área tropical (AT) o área periurbana de la ciudad de Cochabamba (AP), reflejaron ausencia de fluorescencia a nivel de membrana (M0) y de núcleo (N0) en el 38% de las muestras del AT y en el 100% de las muestras AP. La presencia de fluorescencia nuclear con intensidad una cruz (N1) se observó en el 62% de las muestras AT (Figura 4).

Tabla 2. Muestras de sueros según el patrón de fluorescencia que producen con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Datos expresados en frecuencia (%).

Paneles de muestras de suero	Patrón de fluorescencia							
	Nuclear				Membrana			
	Intensidad de fluorescencia				Intensidad de fluorescencia			
	(-)	(+)	(++)	(+++)	(-)	(+)	(++)	(+++)
A (n=23)	0	12(52)	5(22)	6(26)	0	0	0	0
B (n=11)	0	9(82)	1(9)	1(9)	0	9(82)	1(9)	1(9)
C (n=22)	0	0	0	0	0	0	2(9)	20(91)
D (n=33)	25(76)	8(24)	0	0	25(76)	0	0	0

A= Muestras de suero de personas con infección por *leishmania spp*; B= Muestras de suero de personas con infección mixta por *leishmania spp* y *T. cruzi*; C= Muestras de suero de personas con infección por *T. cruzi*; D= Muestras de suero de personas sin ninguna de las dos infecciones estudiadas.

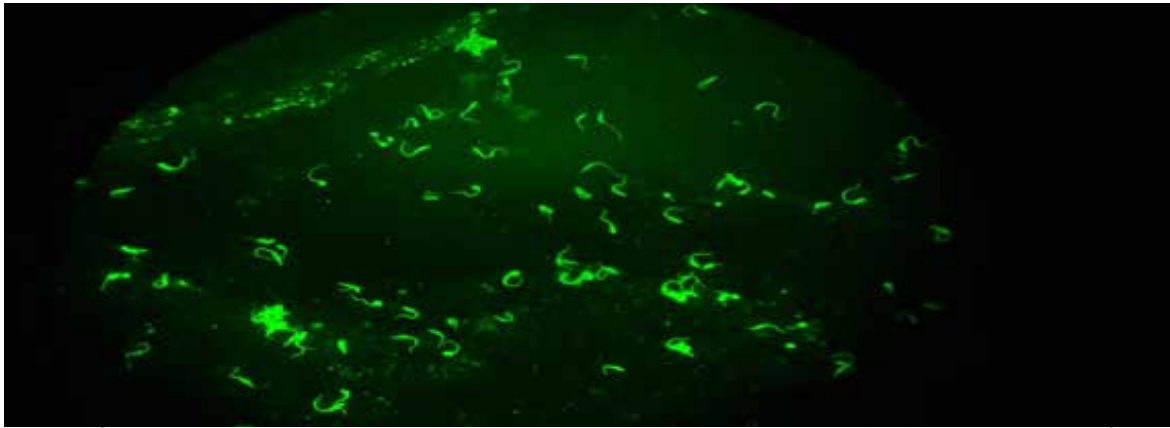


Figura 3. Patrón fluorescencia de membrana otorgan a los epimastigotes de *T. cruzi* empleados como antígeno figurado, una intensidad de fluorescencia periférica que define el contorno de los parásitos. El patrón de fluorescencia de membrana corresponde a muestras de personas identificadas como infección por *Trypanosoma cruzi*. (Panel C)

Discusión

La *Leishmaniasis* y enfermedad de Chagas tienen una amplia distribución, tanto en las áreas rurales y tropicales del Continente latinoamericano. Ambas son consideradas por la OMS como enfermedades tropicales de gran importancia, dentro las “Enfermedades Olvidadas o desatendidas”²³. Estas dos enfermedades son transmitidas por diferentes especies de protozoarios del orden kinetoplástida^{24,25}. Estos tripanosomátidos presentan un único flagelo que sobresale de un bolsillo anterior o bien está insertado lateralmente

y adherido a la célula a lo largo de toda su longitud, características que los hacen muy similares^{22,25}.

Bolivia se ha caracterizado principalmente, por los altos índices de *Leishmaniasis* mucocutánea (MCL), y *Leishmaniasis* cutánea (LC)⁴. El incremento de los casos de *leishmaniasis* en estos últimos años, se atribuyen principalmente a los nuevos asentamientos humanos debido a la migración poblacional, mayoritariamente de zonas endémicas para la enfermedad de Chagas hacia las regiones tropicales^{5,6}, lo cual produce cambios en la conducta de la enfermedad, debido

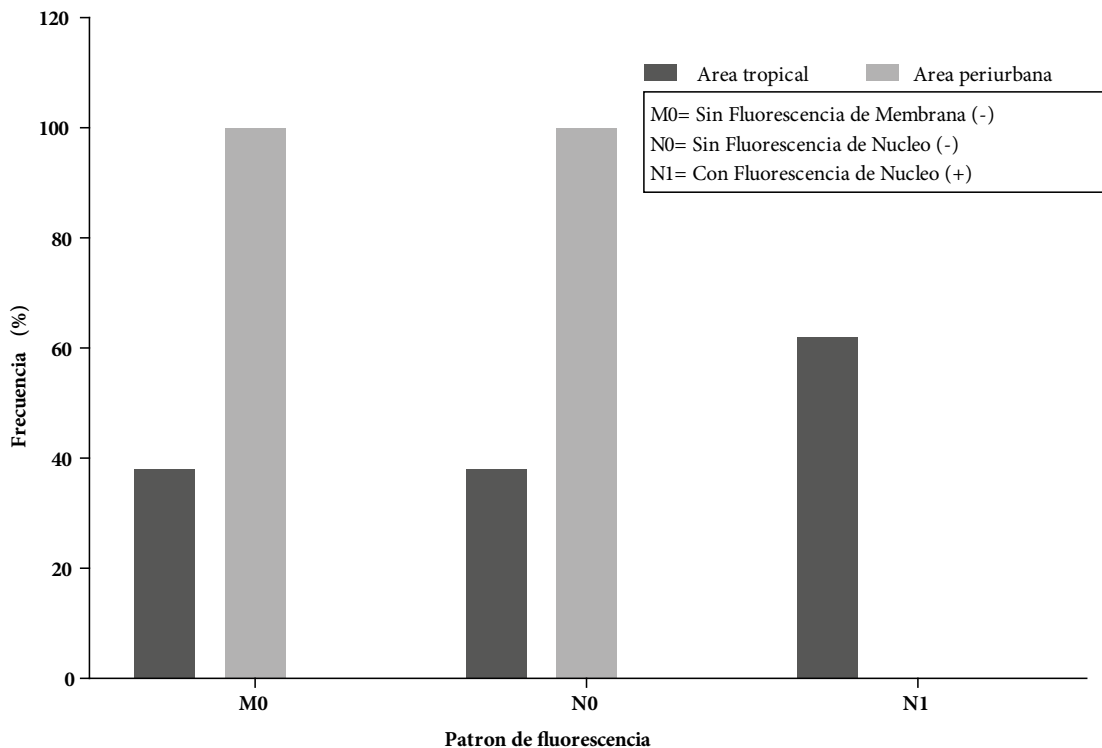


Figura 4. Frecuencia de muestras de suero según el patrón de fluorescencia que producen en la reacción de anticuerpos marcados con fluorocromos que reaccionan con epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, de personas sin evidencias de ninguna de las infecciones evaluadas (*Leishmania* spp y *T. cruzi*). AT= Panel de muestras de suero de personas residentes en área tropical (n= 13); AP= Panel de muestras de suero de personas residentes en el área periurbana de la ciudad de Cochabamba (n=20).

a la coexistencia de ambas enfermedades; es el caso de la región tropical de Cochabamba. De ahí la importancia de detectar ambas patologías en estas regiones donde ambas enfermedades cohabitan, por la repercusión negativa que se podría tener, en el inicio del tratamiento de la Leishmaniasis con Antimoniato de N- metilglumina (Glucantime®), ya que uno de los efectos adversos de este medicamento de primera línea es la cardiotoxicidad²⁶.

El diagnóstico inmunológico de Leishmaniasis y Chagas, presenta problemas respecto a las reacciones cruzadas con diferentes especies de *Leishmania spp* y *Trypanosoma rangeli*^{10,12,27} especialmente en aquellas zonas coendémicas, es por esto que los ensayos convencionales por Inmunofluorescencia suelen tropezar con esta dificultad, debido al tipo de antígeno empleado al momento de detectar anticuerpos anti-*T.cruzi* en personas que presentan coinfección por ambos tripanozomatidos^{10,11,27,28}. En este estudio, para poder determinar el diagnóstico diferencial entre Leishmaniasis y Chagas se empleó como antígeno epimastigotes *T. cruzi*¹⁴, y como se muestra en las Figuras 1 y 2 se observó la existencia del patrón de fluorescencia nuclear con los sueros que corresponden a personas con leishmaniasis (panel A) mientras que para las infecciones mixtas se observó un patrón de fluorescencia nuclear y periférico (panel B), por otro lado, se aprecia un patrón periférico es decir fluorescencia a nivel de membrana con los sueros que corresponden a personas diagnosticadas con enfermedad de Chagas (panel C) (Figura 3) lo cual concuerda con los resultados de un estudio previo^{14,29,30}.

Por otra parte, al realizar la identificación de las muestras provenientes de área tropical (AT) o del área periurbana de Cochabamba (AP) sin evidencia de ninguna de las dos

afecciones (panel D), se evidenció la presencia de fluorescencia nuclear con intensidad de una cruz (N1) en 8/13 (62%) de las muestras provenientes de individuos residentes en el área tropical (Figura 4), aspecto que no se observa en las muestras de sueros de los residentes en el área periurbana. La presencia de fluorescencia en este grupo de población del trópico podría deberse a que el sistema inmune de los individuos residentes del área tropical, promovieron la eliminación directa como indirecta, por fagocitosis del microorganismo agresor, desarrollando posteriormente anticuerpos de memoria que fueron detectados a través de la Inmunofluorescencia, esta sería una de las razones para que dichos individuos no presentasen lesiones clínicas visibles. Por lo tanto, factores como la especie y la virulencia de la *Leishmania* junto con la respuesta inmune y nutricional del hospedero podrían ser responsable de estos resultados³¹.

La técnica de Inmunofluorescencia (IFI) con antígenos de epimastigotes de *T. cruzi* a demostrado utilidad en la diferenciación entre enfermedad de Chagas, Leishmaniasis y/o infecciones mixtas por ambos parásitos en aquellas zonas tropicales donde la coexistencia de ambas es habitual, debido a la migración de personas desde zonas endémicas para Chagas. Por lo tanto, esta técnica; poniendo énfasis en la observación microscópica de los patrones de inmunofluorescencia podría ser interesante además de viable desde el punto de vista técnico y económico como una alternativa dentro las pruebas convencionales.

Agradecimientos

A la Dra. MC Torrico y al Lic. Amilcar Flores por su colaboración para el desarrollo del presente trabajo.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- 1.- Perez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet 2018; 391:82-94. doi:0.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- 2.- World Health Organization. Global health estimates 2016 summary tables: DALYs by cause, age and sex, by WHO region, 2000 -2016. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2018. https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html. consultado: enero 2020.
- 3.- Yager JE , Lozano Beltran DF , Torrico F , Gilman H , Bern C. Prevalence of Chagas heart disease in a region endemic for *Trypanosoma cruzi*: evidence from a central Bolivian community. Glob Heart. 2015; 10(3):145-50. doi: 10.1016/j.ghheart.2015.07.002.
- 4.- Briceño-León R. La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. Cad Saúde Pública 2009; 25 Suppl 1: S71-82.
- 5.- Albarracin-Veizaga H, Carvalho ME , Nascimento EMM, Rodrigues VLCC, Casanova C, Barata JMS. Chagas disease in an area of recent occupation in Cochabamba , Bolivia . Rev Saúde Pública 1999; 33(3): 230
- 6.- Aguilar HM, Abad-Franch F, Pinto-Diaz JC, Veríssimo-Junqueira AC, Rodríguez-Coura J. Chagas disease in the amazons region; Mem. Inst Oswaldo Cruz 2007; 102 (Suppl 1): 31.
- 7.- Maita García X., Miranda Gutiérrez C., Maraño Mendoza L.C., Carvajal Yañez N., Santander López A., Características Epidemiológicas de la Leishmaniasis en el Departamento de Cochabamba Durante el Periodo 2002-2010. Rev Cient Cienc Méd v.14 n2 Cochabamba dic. 2011.
- 8.- Pérez León J.L., Kindelán Mercerón F.M., García Quintana Y. Jorge Felix Prat Ricardo J.F., Leishmaniosis Cutánea en un Adulto Mayor. MEDISAN Vol.19 no.9 Santiago de Cuba set.-set. 2015.
- 9.- Sánchez-Saldaña L., Sáenz-Anduaga E.,Pancorbo-Mendoza J., Zegarra-Del-CarpioR., Garcés-Velasco N., Regis-Roggero A. Leishmaniasis .Dermatología Peruana 2004; vol 14: No 2-82
- 10.- Bastrenta B., Mita N., Buitrago R., F Vargas F, Flores M.,M Machane M., Yacsik N., Torrez M., Le Pont F, Brenière F. Infecciones humanas mixtas de *Leishmania spp.* y *Leishmani a- Trypanosoma cruzi* en un área subandina boliviana: identificación por reacción en cadena de la polimerasa / hibridación e isoenzima. Mem. Inst. Oswaldo Cruz vol.98 no.2 Río de Janeiro marzo de 2003.
- 11.- Gil J., Cimino, Ines R., Lopez Quiroga I., Cajal S., Acosta N., Juarez M., Zacca R., Orellana V., krolewiecki A., Diosque P., Nasser J. Reactividad Del Antígeno GST-SAPA De *Trypanosoma cruzi* Frente a Sueros De Pacientes Con Enfermedad De Chagas y Leishmaniasis. MEDICINA (Buenos Aires) 2011; 71: 113-119
- 12.-Passos VMA, Volpini AC, Braga EM, PAF Lacerda PAF, Ouassai A, Lima-Martins MV, Krettli AU. Serodiagnóstico diferencial de infecciones humanas causadas por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.* Uso de ELISA con un antígeno recombinante (rTc24). Mem. Inst. Oswaldo Cruz Vol. 92 (6): 791-793. Dec. 1997.
- 13.-Delmans F. M Ch., Postigo J., Mita Mendoza N., Cruz I., Alvar Ezquerro J., B. Bastrenta.

- Leishmaniasis visceral subclínica en 123 individuos de un cantón de la provincia Caranavi-La Paz Rev. Soc. Bol. Ped. 2002; 41 (2): 61-66.
- 14.- Frank FM, Fernández MM, Taranto NJ, Cajal SP, Margani RA, Castro E, Thomaz-Soccol V, Malchiodi EL. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved. *Parasitol.* 2003; 126(1), 31–39. doi.: 10.1017/S0031182002002585
- 15.- Romero Peñuela M.H., Sánchez Valencia J.A. Uso de Antígenos Recombinantes para la Evaluación Serológica de Leishmaniasis Visceral y Tripanosomiasis Canina. *Biosalud*, Volumen 8, enero - diciembre, 2009. págs. 77 – 83.
- 16.- Vásquez Huerta L., Ruelas Llerena N., Córdova Benzaquen E. Patrones de coloración en la inmunofluorescencia indirecta y su utilidad en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria y enfermedad de Chagas *Acta méd. peruana* v.28 n.1 Lima ene./mar. 2011.
- 17.- Gomes Y. M. PCR y serodiagnóstico en la enfermedad de Chagas crónica: avances biotecnológicos. *Apl. Biochem. Biotechnol.* 66 1.997 107 119.
- 18.- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14(8): 1045-9.
- 19.-Wendel S, Gonzaga A. La enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre: ¿un problema del nuevo universo? *Vox Sang.* 1993; 64 : 1–12.
- 20.-Escalante H, Jara C, Davelois K, Iglesias M, Benites A, Espinoza E. Estandarización de la técnica de Western Blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2014;31(4):644-51.
- 21.- Requena JM, Soto A. Evolutionarily Conserved Proteins as Prominent Immunogens during *Leishmania* Infections. *Parasitology Today* 2000;16(6):246-250.
- 22.-Levin M, Mesri E, Benarous R, Levitos G, Schijman A, Leyati P, Chiale P, Ruiz A M, Khan A, Rosenbaum M, Torres HN, Segura EL. Identificación de los principales determinantes antigénicos de *Trypanosoma cruzi* en la enfermedad de Chagas crónica. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41 530 538.
- 23.-World Health Organization. The 17 neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2014, disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (consultado 15 de febrero de 2020)
- 24.- Lake J A, De La Cruz V F, Ferreira P G, et al. Evolution of parasitism: Kinetoplastid protozoan history reconstructed from mitochondrial rRNA gene sequences. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 4779-83
- 25.-Vargas-Parada, L. (2010) Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. *Educación de la naturaleza* 3 (9) : 63.
- 26.- Felipe Silva de Freitas P., Rodrigues Borges R., Hiroshi Sakamoto L.B., Naves Gonçalves M., Marilene da Silva A., Dutra de Moura F.J., Ribeiro Sampaio R.N., Joel Paulo Russomano Veiga J.P. AVALIAÇÃO DO ELETROCARDIOGRAMA DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA TRATADOS COM ANTIMONIAL PENTAVALENTE (GLUCANTIME®) *Rev Patol Trop* Vol. 43 (4): 405-411, 2014.
- 27.-Ana de Cássia Vexenat A., Santana J.M., Teixeira A.R.L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* vol.38 no.3 São Paulo May/June 1996
- 28.-Mita N. Infecciones Mixtas: Identificación de complejos de *Leishmania* sp y clones de *Trypanosoma cruzi* por PCR-hibridación en pacientes y mamíferos peridomiciliares de los Yungas, La Paz. Tesis de licenciatura en bioquímica 2001; UMSA.
- 29.-Chiller TM, Samudio MA, Zoulek G 1990. Reactividad de anticuerpos IgG con antígenos de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas y leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 22 : 696-698
- 30.-Chiaramonte MG, Zwirner NW, Caropresi SL, Taranto NJ, Malchiodi EL 1996. *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. Infección mixta humana . *Am J Trop Med Hyg* 54 : 271-273.
- 31.-Milena Lenis A. La respuesta celular inmune en la leishmaniasis cutánea americana. *Biomedica* 1998; 18(4)274-284.