

Jorge Fraga<sup>1</sup>, Ana M. Montalvo<sup>1</sup>, Jose Ángeles Chimalt<sup>2</sup>, Maria Elena Villagrán<sup>3</sup>, Lilian Juárez<sup>4</sup>, Bertha Espinosa<sup>5</sup>,

Ana Maria Mejias<sup>6</sup>, Omar Triana<sup>6</sup>, Gert Van der Auwera<sup>7</sup>.

1- Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba

2- Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

3- Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Querétaro, México.

4- Instituto Nacional de Salud, México

5- Universidad Nacional Autónoma de México

6- Universidad de Antioquia, Colombia.

7- Instituto de medicina Tropical de Amberes, Bélgica

e-mail: fraga@ipk.sld.cu

- Las poblaciones naturales de *T. cruzi* se constituyen de clones múltiples distribuidos en 6 Unidades Discretas de Tipificación (UDT) (TcI al TcVI), Tcbat de diferente distribución geográfica y circulación en los ciclos de transmisión.
    - En los últimos años se ha avanzado en el estudio de la comprensión de la genética y diversidad del parásito, proporcionando información acerca de la evolución, el comportamiento biológico y los patrones epidemiológicos; la historia natural de la infección; y problemas relacionados con el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. Sin embargo aun existe un amplio debate sobre el tema.
  - Importante contar con métodos moleculares más simples y/o estrategias más sencillas y reproducibles para la identificación de los linajes del parásito, que estén disponibles para su uso generalizado en áreas endémicas, manejable en cualquier laboratorio y puedan aplicarse directamente a muestras clínicas y biológicas.
    - El gen que codifica la *hsp70* citoplasmática de *T. cruzi* constituye un marcador genético promisorio para la diferenciación de linajes, el análisis filogenético dentro de los aislamientos de *T. cruzi*, mostro cuatro grupos genéticos, correspondiente a las UDT: TcI, TcIII, TcIV y los DTUs TcII, TcV y TcVI que no forman entidades separadas.
- OBJECTIVO:** Diseñar y evaluar un método de PCR-RFLP basado en el gen que codifica la *hsp70* citoplasmática de *T. cruzi* para la detección y diferenciación de las UDT a partir muestras clínicas, vectores y reservorios.

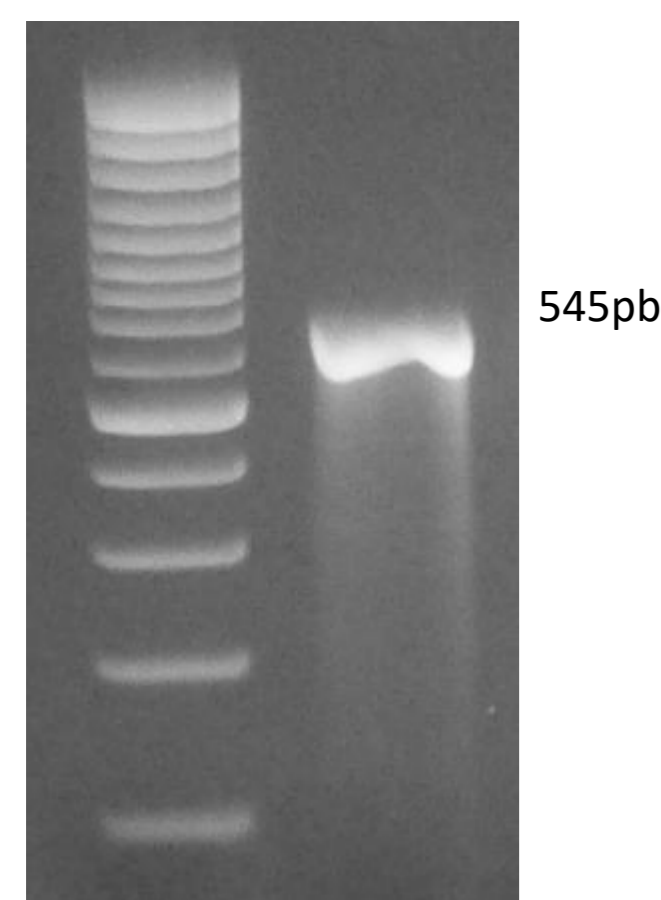
## METODOLOGIA

- Diseño de la PCR *hsp70* DTU (Alineamiento de secuencias *T. cruzi* Banco de genes). Fraga et al., 2016
- Normalización de la PCR *hsp70* DTU (MgCl<sub>2</sub>, Cebadores, Taq ADN pol, Temperatura de alineamiento).
  - Propuesta de enzimas de restricción (RFLP) para diferenciación de linajes (análisis *in silico*).
    - Sensibilidad y especificidad analítica de la PCR *hsp70*
  - Evaluación de la PCR-RFLP *hsp70* DTU en un panel de 36 aislamientos de *T. cruzi* bien caracterizados.
- Evaluación en muestras clínicas, vectores y reservorios de la PCR-RFLP *hsp70* DTU (n=293), procedentes de diferentes países (Colombia, México, Argentina, Belice, Bolivia)

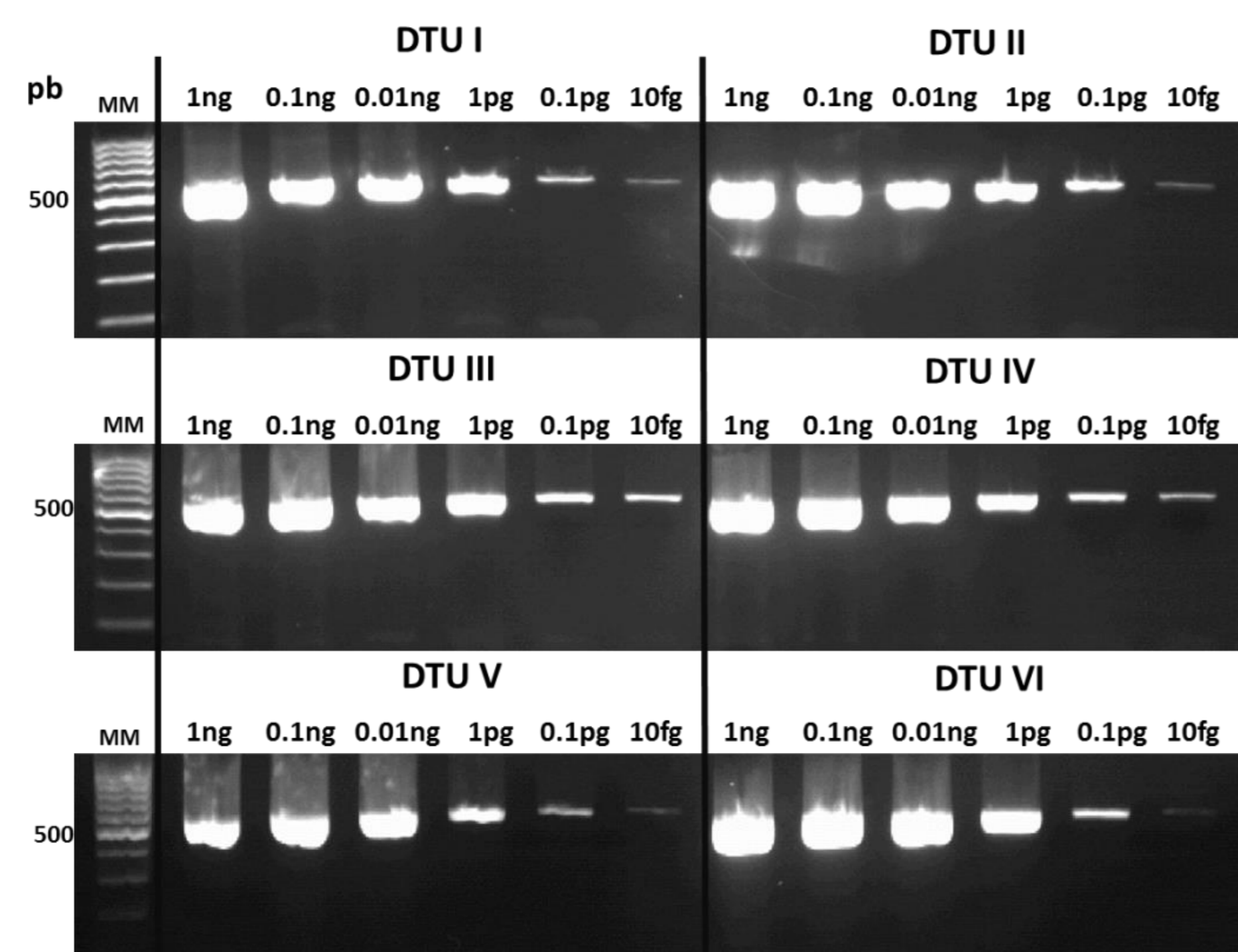
## RESULTADOS

### PCR-RFLP *hsp70* DTU

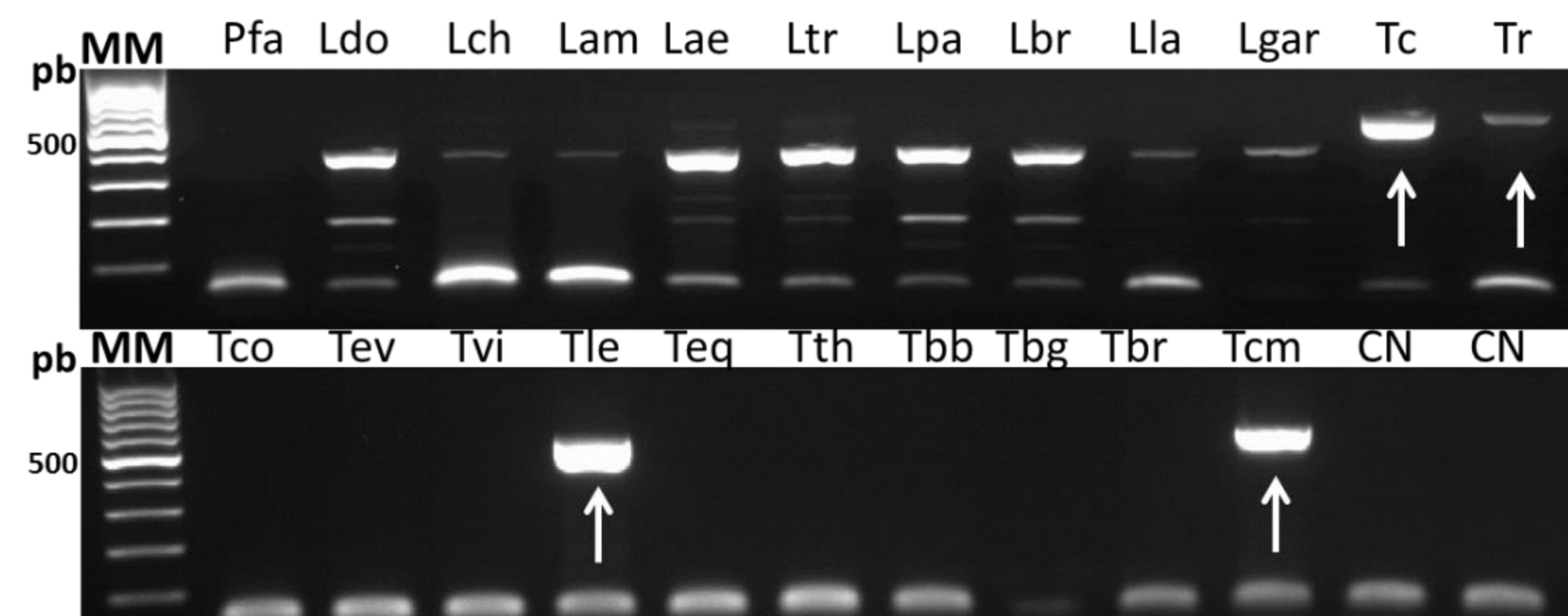
#### PCR *hsp70* DTU



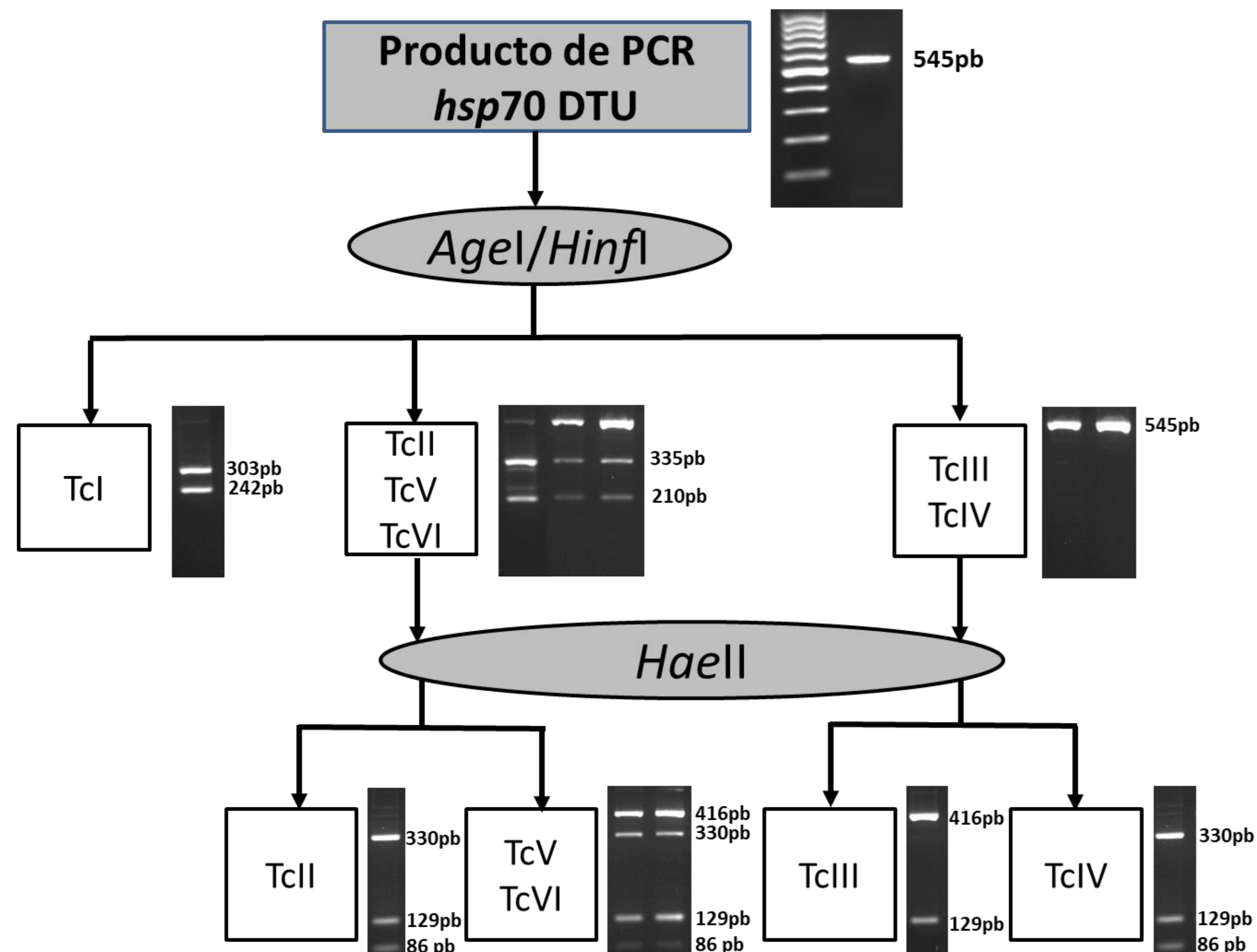
#### Sensibilidad analítica



#### Especificidad analítica



#### RFLP *hsp70* DTU



#### Evaluación en muestras clínicas de humanos, triatomíneos y reservorios

	PCR-RFLP <i>hsp70</i> DTU	% Tipificación	DTU
<b>Humanos</b> n=248			
Colombia n= 121	34	62.2 %	25 TcI 2 TcII 2 TcIII 2 TcV 2 TcV o VI 1 Mixto (TcI-TcIV)
Bolivia n=38	25		21 TcII 1 TcIV 1 TcI 2 Mixtos(TcI-TcII)
Belice n=1	1		1 TcI
Cuba n=1	1		1 TcV o VI
Argentina n=2	1		
México n= 85	45		39 TcI 2 TcI-TcII 1 TcI-TcIV 1 TcIII 1 TcIV 1 TcI-TcIII
<b>Triatomas (COLOMBIA)</b> n=19	16	84.2 %	10 TcI 2 TcII/TcV/TcVI 1 TcIII 1 TcIV 2 Mixto (TcI-TcII/TcV/TcVI)
<b>Reservorios (COLOMBIA)</b> n=26	12	46.2 %	10 TcI 1 TcIV 1 Mixto (TcI-TcV)
<b>% TIPIFICACIÓN n=293</b>		<b>46.07 %</b>	

## Referencias

Fraga J, Fernández-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Deborggraeve S, Büscher P, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogenetic analysis of the Trypanosoma genus based on the heat-shock protein 70 gene. Infect Genet Evol. 2016 Sep;43:165-72. doi: 10.1016/j.meegid.2016.05.016. Epub 2016 May 13. PMID: 27180897.

## CONCLUSIONES

- El gen de la *hsp70* citoplasmática constituye un blanco genético que permite la diferenciación de los linajes de *T. cruzi*.
- La PCR *hsp70* DTU permite la detección directamente en muestras clínicas con alta sensibilidad y especificidad analítica.
- La PCR-RFLP *hsp70* DTU permite la detección directa en muestras clínicas, triatomas y reservorios de los principales linajes del parásito aunque necesita la combinación con otro método molecular para diferenciar los linajes V y VI.

## Agradecimientos

A todos los investigadores y laboratorios que gentilmente donaron sus cepas de *T. cruzi* y muestras para este estudio. •Financiamiento de la Cooperación Belga para el desarrollo y el Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.