

Gen de la proteína de choque térmico 70 kDa para la detección y diferenciación de *T. cruzi*.



Jorge Fraga I; Niurka E. Tamayo II; Ana M. Montalvo III, José
Ángeles Chimal† IV; María Elena Villagrán V; Lilia Juárez Palma VI;
Bertha Espinosa VII; Ana Maria Mejias Jaramillo VIII; Omar Triana
IX; Gert Van der Auwera X.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA

- I. Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba. fraga@ipk.sld.cu. ORCID: 0000-0001-9061-2550
- II. Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba. ORCID: 0000-0002-6980-5371
- III. Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba. ORCID: 0000-0001-5776-937X
- IV. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. ORCID: 0000-0003-0475-2798
- V. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Querétaro, México. ORCID: 0000-0002-5858-5596
- VI. Instituto Nacional de Salud, México.
- VII. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: 0000-0002-4232-528X
- VIII. Universidad de Antioquia, Colombia. ORCID: 0000-0003-2125-9858
- IX. Universidad de Antioquia, Colombia. ORCID: 0000-0001-8031-0225
- X. Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica. ORCID: 0000-0002-3742-7046

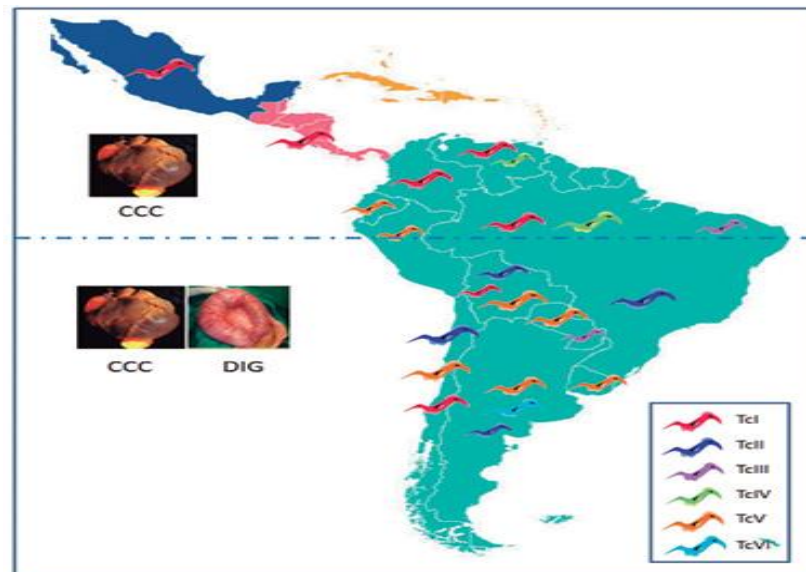


ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad es endémica en 21 países, y afecta a 6-7 millones de personas, aunque las migraciones de personas infectadas pueden llevarla a países no endémicos de América y el Mundo.

30 mil casos nuevos anuales por todas las formas de transmisión
12 mil muertes anuales

Trypanosoma cruzi



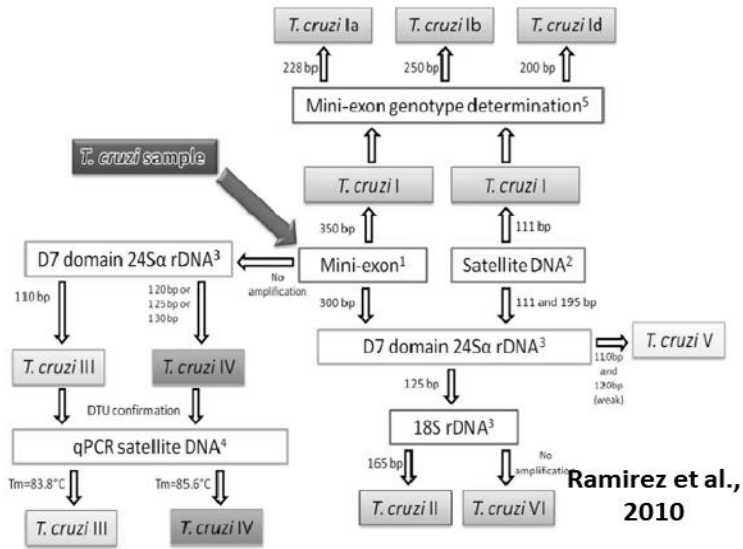
Triatomineos



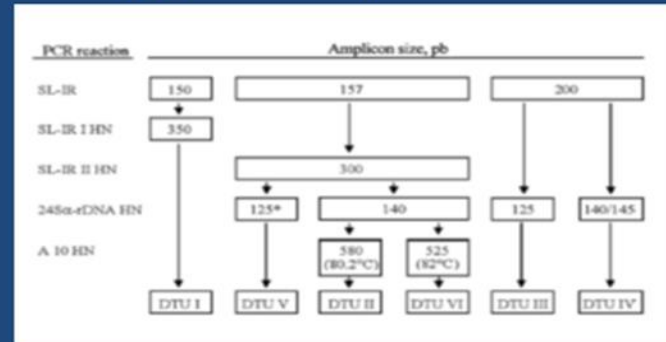


DIAGNÓSTICO MOLECULAR

- En infecciones que cursan con bajas parasitemias. **ETAPA CRONICA**
- **Chagas congénito**, en recién nacidos. **PCR HAN DEMOSTRADO ALTA SENSIBILIDAD**
- En pacientes con inmunodeficiencias o en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales, la producción de anticuerpos es deficiente. **REACTIVACIÓN.**
- También, en el **seguimiento a los pacientes en tratamiento** donde los métodos inmunológicos no son adecuados, ya que la respuesta de anticuerpos se mantiene por mucho tiempo.
- **Confirmación después del "screening" de donadores de sangres.**
- Además, la **PCR es muy importante en individuos no respondedores o con niveles bajos de anticuerpos.**
- En trasplantes de órganos.
- En **brotes de Chagas por transmisión oral.**
- Para diferenciar infección por *T. cruzi* de infección por *T. rangeli*.

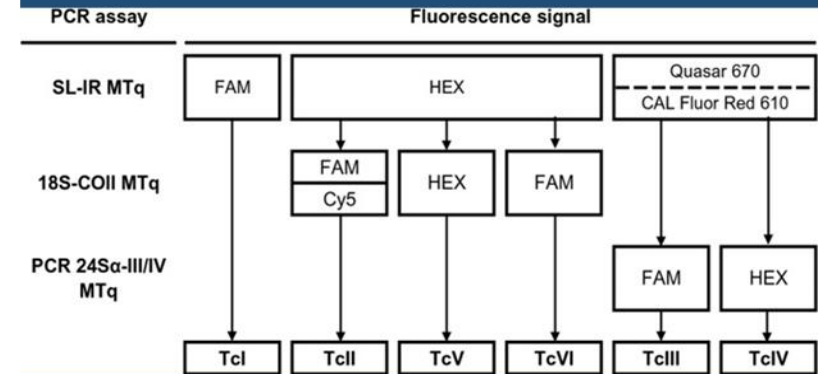


Flujogramas de Tipificación *T. cruzi*



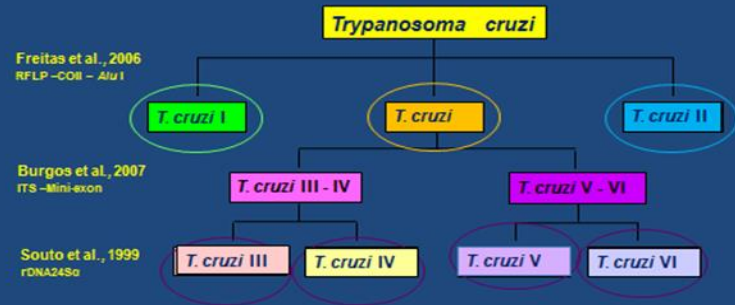
Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation

PCR en tiempo real-Múltiple



Cura et al., 2015

Flujogramas de Tipificación *T. cruzi*



Andrea M. Macedo 2011

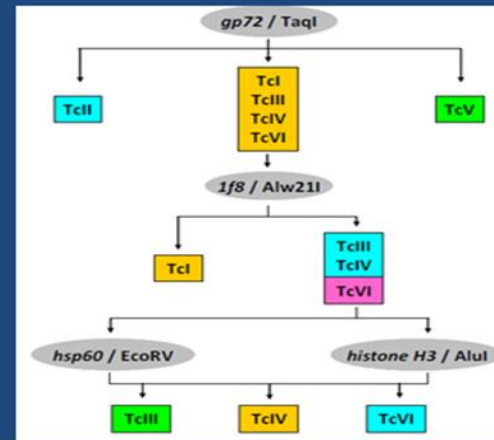
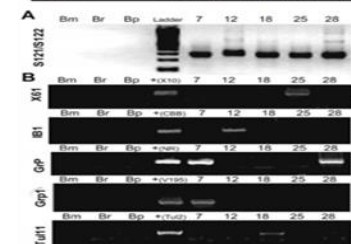


Table 2 Oligonucleotide primers for each MLS-PCR, annealing temperature (Ta), DTU that amplify with their corresponding amplicon sizes.

Primers	DTU	Sequence	Ta (°C)	Product (bp)
X61-f	TcI	5'-TGATATACCACTACCACGTTACC-3'	65	111
X61-r	TcI	5'-AGATAGAGTGCCTGTGAGATGAGT-3'	47	187
X71-f	TcII	5'-ATTTCTATACCACTTTA-3'	63	168
X71-r	TcII	5'-TATGTTGTTTATTGTTAGT-3'	55	206
IB1-f	TcIII	5'-ACACGCAAAACCACTCTACTACA-3'	55	200
IB1-r	TcIII	5'-ATTATGTTATGCTCTCTGCTGGA-3'	55	175
GrP-f	TcIV	5'-GGGATTAGGTTATACCTAGTGGC-3'	39	163
GrP-r	TcIV	5'-TTCCAAACCCCAAAATGATA-3'		
GrO-f	TcV	5'-GGCTTAGGGTGTGGATAGG-3'		
GrO-r	TcV	5'-ATCCGCAAAACCACTACA-3'		
Grp1-f	TcVI	5'-ATCCAGACCCCAATTTTACTAC-3'		
Grp1-r	TcVI	5'-ATGTGATTGGATAGGTGATAGAT-3'		
Tu11-f	TcVI	5'-AATTTCCTATTTCCTGA-3'		
Tu11-r	TcVI	5'-TTTATAGTGGTATGTTGAGT-3'		



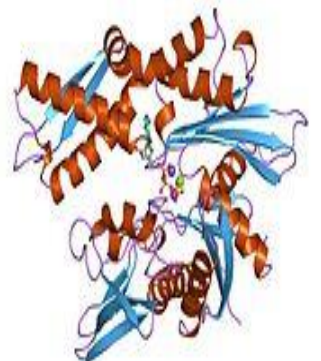
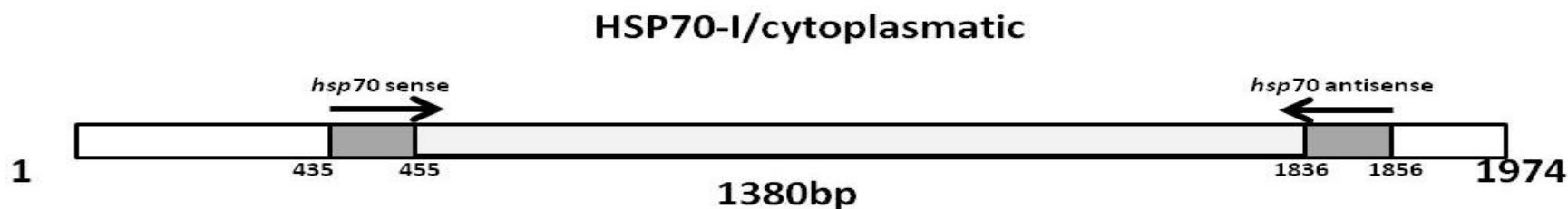
Nest-PCR kDNA

Bomtempo et al., 2016

NECESIDAD DE BUSCAR ALTERNATIVAS DE DETECCIÓN MAS SENCILLAS

Proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70)

- Marcador evolutivo promisorio. ESTUDIOS FILOGENÉTICOS. Ejemplos: *Cryptosporidium* spp. *Babesia* spp., *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., *Microsporidium* spp., *Blastocystis hominis*, *Leishmania* genus.
- Proteína HSP70 es altamente conservada en secuencia y función.
- Chaperona molecular- plegado de la proteína -transporte.
- El gen se organiza en repeticiones en tandem de la cabeza a la cola. Ejemplo: *T. cruzi* – tiene al menos 7 copias
- PCR-RFLP para diagnóstico e identificación de especies de *Leishmania* (García et al. 2007; Fraga et al. 2012; Montalvo et al. 2012, 2014, 2017; Veland et al. 2012)





ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL GEN HSP70 ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO TRYPANOSOMA

Trypanosoma



1380 nucleotidos alineados
Región rica en GC 60.6 %
854 Sitios conservados (61.9%)
526 Sitios variables (38.1%)
412 Sitios parsimoniosamente informativos (29.8%)
75- 100 % (86.8%) Similaridad



Marcador Molecular
apropiado
TIPIFICACIÓN ESPECIES

MÉTODOS BIOLOGIA
MOLECULAR
(PCR, PCR dúplex, PCR en
tiempo real, PCR-RFLP,
secuenciación)

65 cepas
11 especies de *Trypanosoma*

$dN/dS < 1$. Selección purificadora- preservar la funcionalidad de la HSP70

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL GEN *hsp70* ENTRE ESPECIES DE *T. cruzi*, *T. rangeli* y *T. cruzi marinkellei*

1380 nucleotidos alineados

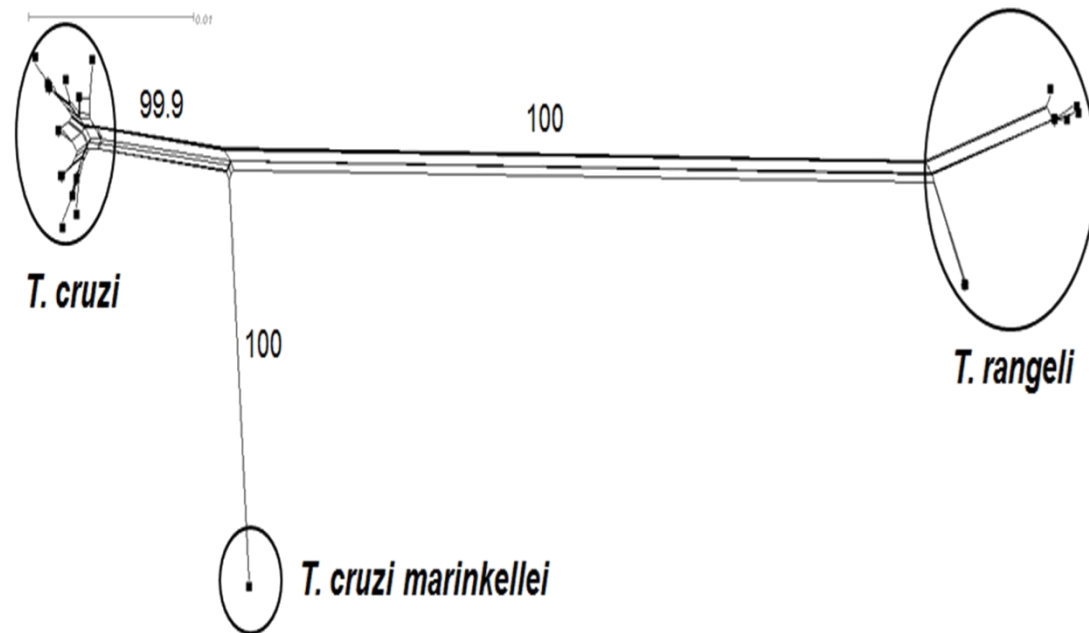
Región rica en GC 63.2 %

1243 Sitios conservados
(90.1%)

137 Sitios variables (9.9%)

99 Sitios parsimoniosamente
informativos (7.2%)

96.6- 99.6 % Similaridad



Red filogenética basado en la secuencia del gen *hsp70* utilizando el Programa SplitsTree 4.

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL GEN *hsp70* ENTRE UDTs DE *T. cruzi*

Red filogenética entre las secuencias de *hsp70* de *Trypanosoma*

1380 nucleotidos alineados

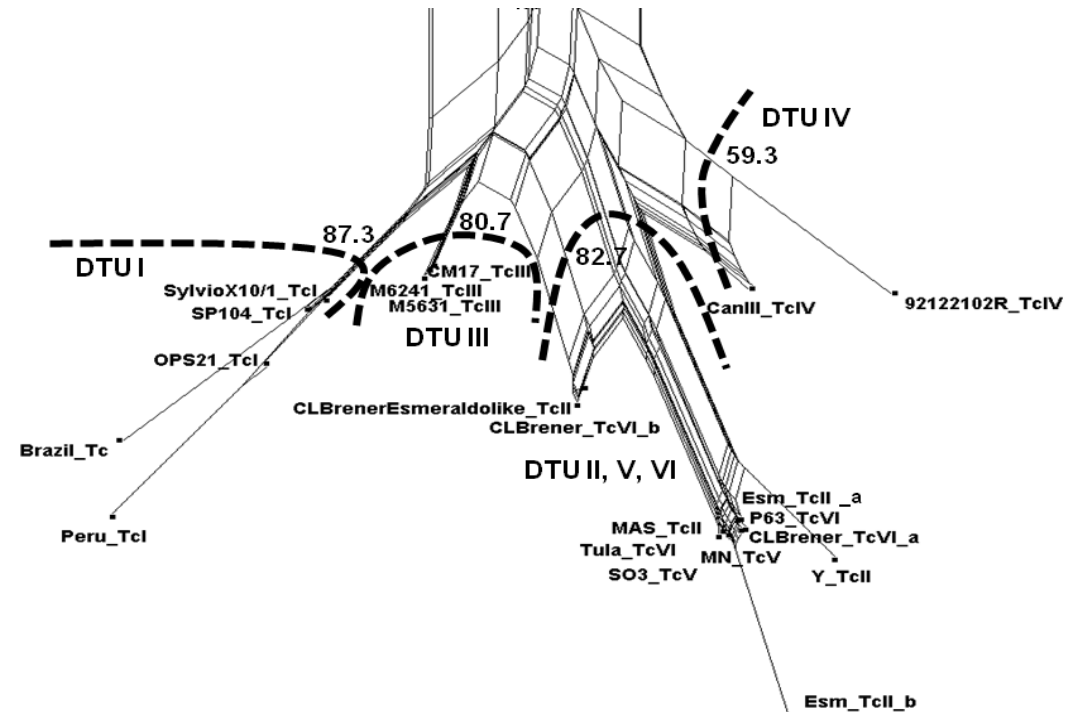
Región rica en GC 62.4 %

1277 Sitios conservados
(92.5%)

103 Sitios variables (7.5%)

10 Sitios parsimoniosamente
informativos (0.7%)

98.7 % Similaridad

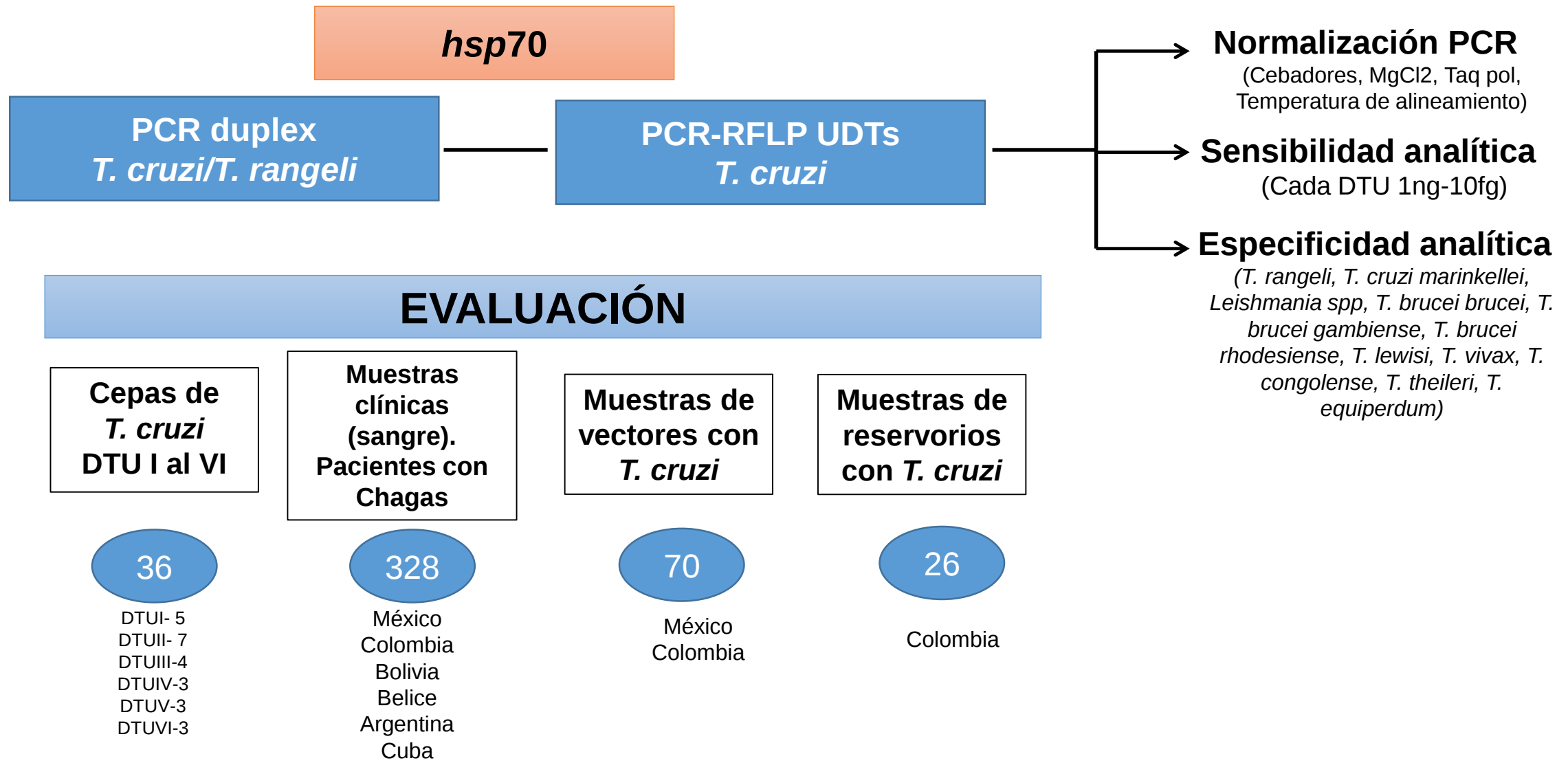


Cuatro grupos *T. cruzi* (TcI, TcIII, TcIV y TcII+V+VI) fueron identificados



Objetivo:

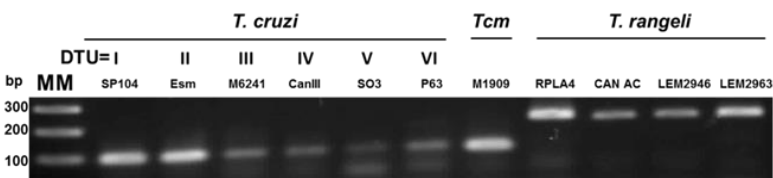
Diseñar, optimizar y evaluar dos métodos moleculares uno para la detección y diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* y el otro para la tipificación de los linajes de *T. cruzi*.





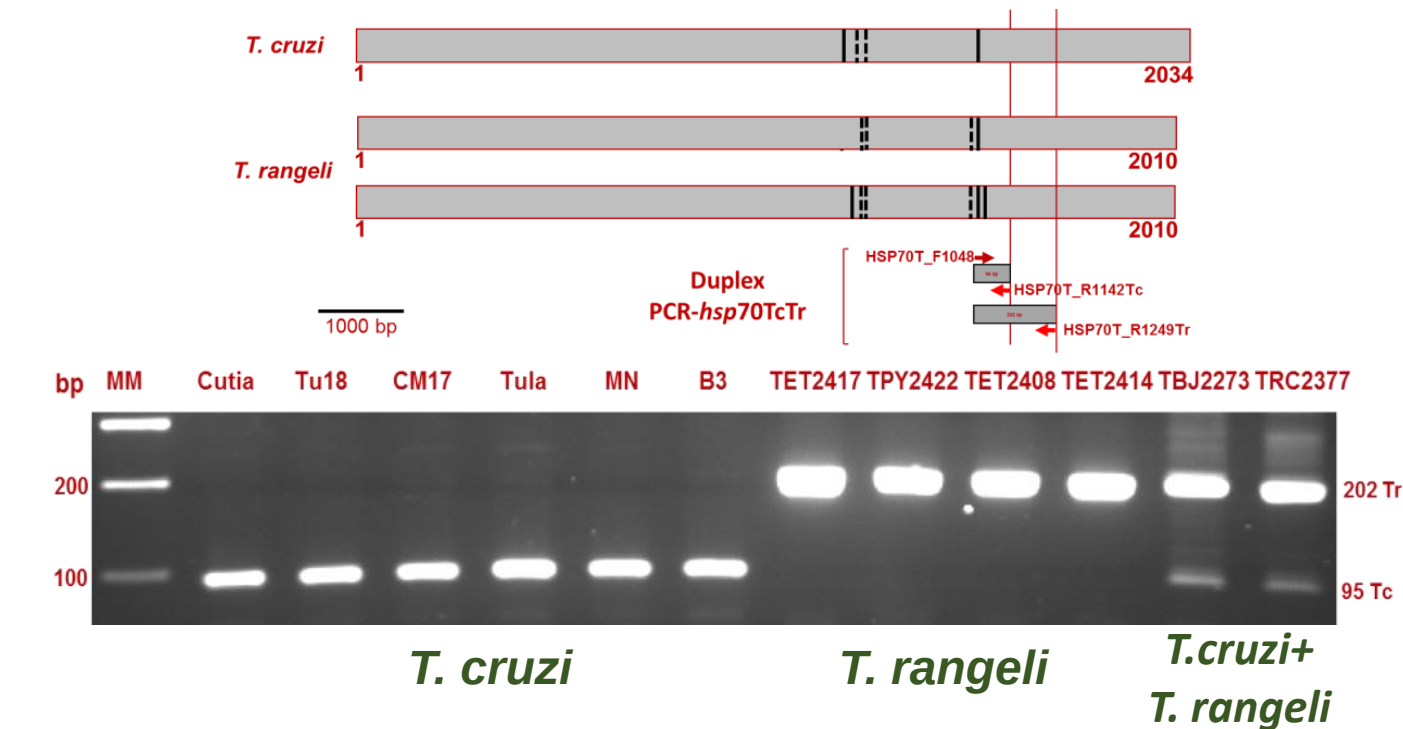
PCR duplex *hsp70* TcTr

Sensibilidad analítica



Especificidad analítica

NEGATIVO A: *Trypanosoma brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. theileri*, *T. evansi*, *Leishmania (L.) infantum (chagasi)*, *L. (L.) mexicana*, *L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Candida albicans*, *Candida parasilopsis*, *Cryptococcus neoformans*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium habana*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Epstein-Bar virus*, *herpes zoster virus*, *herpes simplex virus*, and *cytomegalovirus*.



Duplex PCR *hsp70* TcTr validation with biological samples.

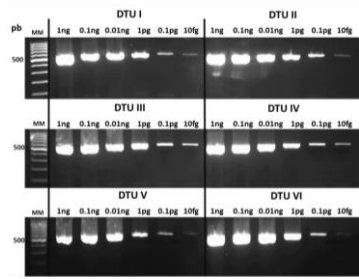
	Duplex PCR <i>hsp70</i> TcTr	Positiity
Humans n= 348		
Colombia n=121	86 82 Tc/ 4 TcTr	75.3%
Bolivia n=38	30 Tc	
Belice =1	1 Tc	
Cuba n=1	1 Tc	
Argentina n=2	2 Tc	
México n=185	142 Tc	
Triatomine bus n=70		
México n=51	43	82.8 %
Colombia n=19	15 11 Tc/1 Tr /3TcTr	
Reservoirs n=25		
Colombia n=26	25 22 Tc/1Tr/2TcTr	96.1 %
Positivity % n=444	77.7%	

SENSIBILIDAD- 77.7 % (444 casos positivos)

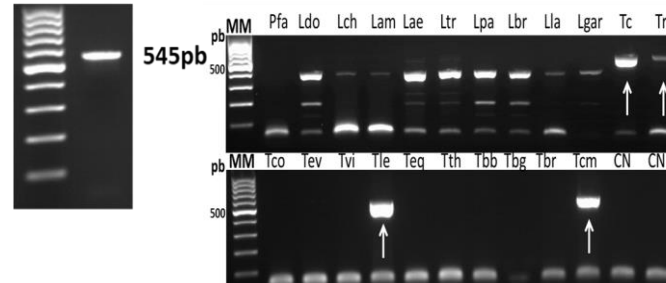
ESPECIFICIDAD- 100 % (677 casos negativos)

PCR- RFLP *hsp70* UDT

Sensibilidad analítica

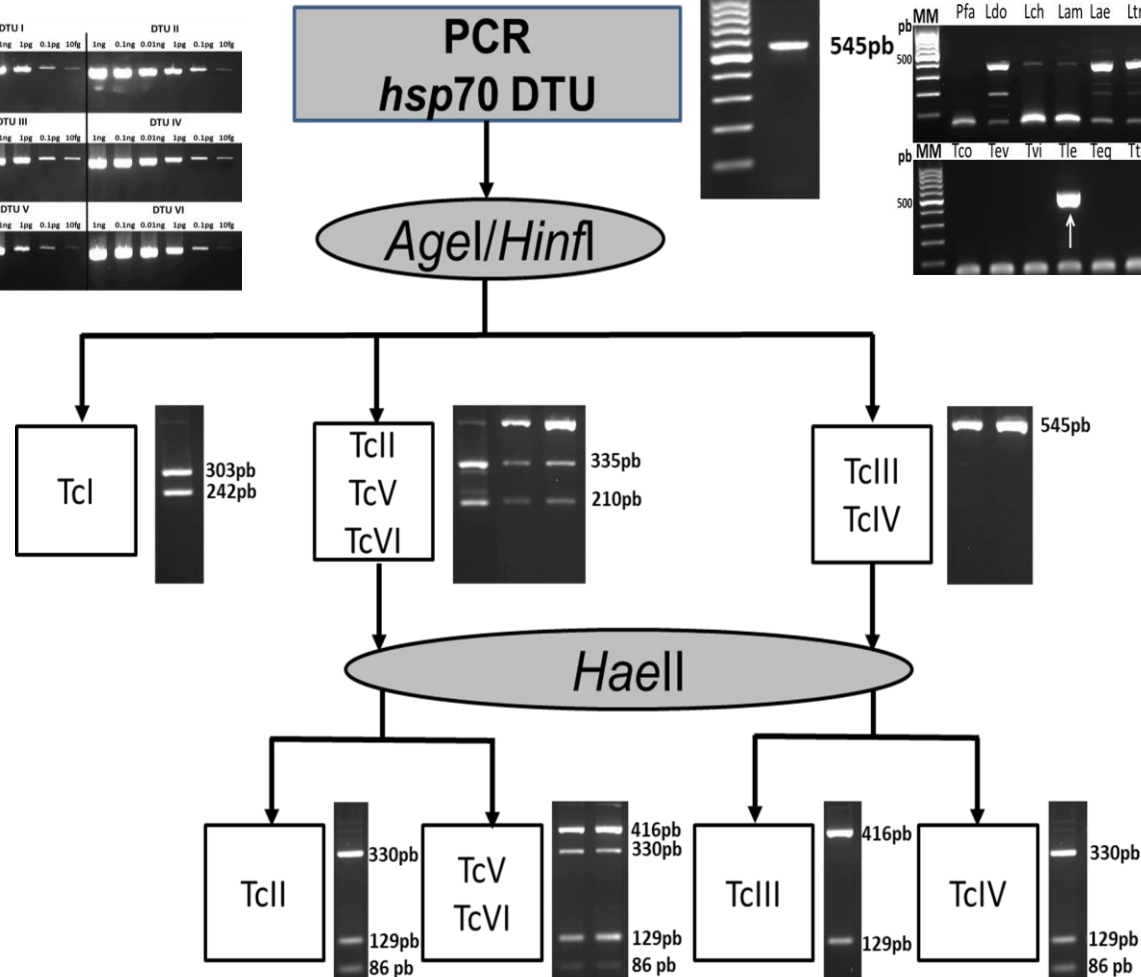


Especificidad analítica



Validación del algoritmo de genotipificación PCR-RFLP *hsp70* UDTs en muestras biológicas

	PCR-RFLP hsp70 DTU	TYPING %	DTU
Humans n=348			
Colombia n= 121	48	46.8%	32 Td 7 TcII 1 TcIII 4 TcIV 2 TcV o VI 2 Mixed (TcI-TcIV)
Bolivia n=38	25		15 Tc o TcVI 6 TcI 2 TcII 1 TcIV 1 Mixed (TcI-TcII)
Belice n=1	1		1 TcI
Cuba n=1	1		1 TcI
Argentina n=2	1		1 TcV o VI
Mexico n= 185	87		77 Td 2 Mixed TcI-TCII 3 MixedTcI-TcIV 1 TcIII 2TcIV 1 Mixed TcI-TcIII 1 Mixed TcI- TcV o TcVI
Triatomine bugs n= 70			
Mexico n=51	30	65,7%	24 Td 6 Mixed (TcI-TcIV)
Colombia n=19	16		10 Td 2 TcII/TcV/TcVI 1 TcIII 1 TcIV 2 Mixed (TcI-TcII/TcV/TcVI)
Reservoirs n= 26			
Colombia n=26	12	46.2 %	10 Td 1 TcIV 1 Mixed (TcI-TcIV)
TYPING % n=444	49.7%		



POSTER



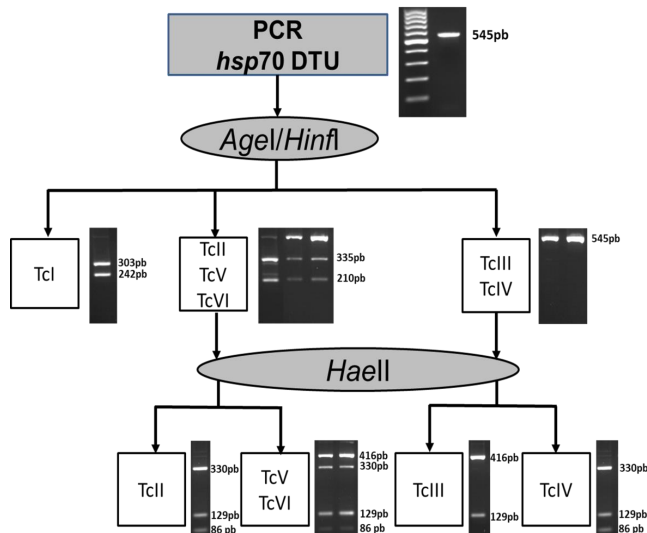
17. Detección de Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* en muestras clínicas y su asociación con el origen geográfico y la presentación clínica.

Niurka Esmirna Tamayo Pérez, Jorge Fraga Nodarse
Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Cuba.
Correo: niurka.tamayo@ipk.sld.cu

Distribución de las UDTs en función del origen geográfico

	PCR-RFLP hsp70 DTU	DTU
	Humans n=348	
Colombia n= 121	48	32 TcI 7 TcII 1 TcIII 4 TcIV 2 TcV o VI 2 Mixto (TcI-TcIV)
Bolivia n=38	25	15 Tc o TcVI 6 TcI 2 TcII 1 TcIV 1 Mixtos (TcI-TcII)
Belice n=1	1	1 TcI
Cuba n=1	1	1 TcI
Argentina n=2	1	1 TcV o VI
México n= 185	87	77 TcI 2 Mixtos TcI-TcII 3 Mixtos TcI-TcIV 1 TcIII 2 TcIV 1 Mixtos TcI-TcIII 1 Mixtos TcI- TcV o TcVI

348 muestras de pacientes
T. cruzi positivos
(Forma Cardíaca, digestiva y asintomática)
Colombia, Bolivia, Mexico, Belice y Argentina



163 muestras
tipificadas.
46.8 %
Infección simple 93.8%
(153/163)
Infección mixta 6.1%
(10/163).

Distribución de las UDTs en función de las manifestaciones clínicas

	No	TcI	TcII	TcIII	TcIV	TcV o VI	Mix
Clinical forms Chagas diseases	Cardiac	51 45 (88.2%*)	1 (2.0%)	1 (2.0%)	3 (5.9%)	2 (3.9%)	0
	Digestive	12	0	2 (16.6%)	0	0	10 (83.3%)
	Asymtomatic (Indeterminate)	100	72 (72.0%)	6 (6.0%)	1 (1.0%)	4 (4.0%)	10 (10.0%)

* $p < 0.05$ Estadísticamente significativo



Conclusiones:

- El gen *hsp70* citoplasmático constituye una diana genética que permite la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* y una diferenciación de UDTs de *T. cruzi*.
- Presentamos dos herramientas moleculares sobre la base de una única PCR (PCR dúplex y PCR-RFLP) que permiten la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* y de las UDTs de *T. cruzi*.
- La PCR dúplex y la PCR-RFLP *hsp70* UDTs permite la detección directa en muestras clínicas, triatomas y reservorios de *T. cruzi* y *T. rangeli* y de los principales linajes del parásito, aunque necesita la combinación con otro método molecular para diferenciar los linajes V y VI.
- Los resultados obtenidos contribuyen a las compilaciones de estudios de distribución geográfica de los UDTs prevalentes en humanos, vectores y reservorios en áreas endémicas.



Ana Margarita Montalvo
Fidel Angel Nuñez
Lázara Rojas
Niurka Tamayo
Alexander Morales

Gert Van der Auwera
Ilse Maes
Jean Claude Dujardin



ESCUELA LATINOAMERICANA DE MEDICINA, CUBA

Lineth García. IBISMED, Cochabamba, Bolivia.

Omar Triana, Ana M. Jaramillo, Omar Cantillo, Universidad de Antioquia, Colombia.

José Ángeles Chimal, Marcela Belen Lara, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

María Elena Villagrán, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Querétaro, México.

Hilda Rangel, Lilian Juárez, Instituto Nacional de Salud, México

Bertha Espinoza, Universidad Nacional Autónoma de México



Belgium

partner in development