

**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro Hospitalario Universitario
Departamento de Anatomía Patológica**

Tesis para optar por el título de Máster en Parasitología

Evaluación de la PCR-RFLP basada en el gen *hsp70* para la
detección de linajes de *Trypanosoma cruzi*

Autor: Dr. Alexander Morales Fontaine

Tutor:DrC. Jorge Fraga Nodarse

Asesora:DrCs. Virginia Capo de Paz

La Habana, 2023

En el campo de la observación, la oportunidad sólo favorece a la mente
preparada.

LOUIS PASTEUR

Dedicatoria

A mis padres, por su dedicación e incondicional apoyo a todos mis emprendimientos.

Agradecimientos

A mis compañeros del Departamento de Patología, por su comprensión y acompañamiento en esta empresa

Resumen

La infección por *Trypanosoma cruzi* es una zoonosis compleja, transmitida por más de 100 especies de insectos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) y sostenida por más de 70 géneros de mamíferos hospederos. La diversidad genética y biológica del agente protozoario de la enfermedad de Chagas es ampliamente reconocida. Este parásito se ha subdividido en siete linajes genéticos o unidades discretas de tipificación (UDT), llamadas TcI-TcVI y TcBat. Se encuentra ampliamente documentado que el intercambio genético en *T. cruzi* es frecuente y esto ha formado a las actuales estructuras de las poblaciones del parásito. La asociación de ciertas UDT con sus reservorios y vectores silvestres está bien establecida. La distribución geográfica de los linajes prevalentes en humanos desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y los datos eco-epidemiológicos ya están disponibles. La discriminación de los linajes se ha convertido en un tema importante en la epidemiología molecular de *T. cruzi*. Existen muchos reportes que muestran algoritmos para la caracterización molecular de estas UDT, pero hoy en día no existe un protocolo de consenso para la identificación de los genotipos. Se están realizando investigaciones para optimizar la sensibilidad y simplificar las técnicas de tipificación para que se puedan aplicar más fácilmente, directamente a partir de muestras clínicas y biológicas, que sean manejables en cualquier laboratorio y adoptadas por la comunidad científica de investigaciones de *T. cruzi*. En nuestras condiciones se diseñó, optimizó y evaluó la PCR-RFLP *hsp70* UDT para la detección y diferenciación de las UDT de *T. cruzi* basado en el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70kDa (*hsp70*). Este método se evaluó en un panel de referencia de 36 aislados de *T. cruzi* bien caracterizados y en 55 muestras de vectores, reservorios animales y humanos recolectados de Bolivia, Belice, Colombia y México. La PCR-RFLP *hsp70* UDT permite la tipificación de los linajes de parásitos directamente a partir de muestras clínicas de humanos, reservorios animales y triatomíneos en aproximadamente un 50%, aunque necesita la combinación con otra herramienta molecular para diferenciar las UDT V y IV. Presentamos así un método de PCR-RFLP que permite la identificación de UDT de *T. cruzi* en base a una única PCR. La técnica es simple de realizar y se puede implementar en todos los entornos donde la PCR esté disponible.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas, *hsp70*, UDT, PCR, PCR-RFLP, epidemiología molecular.

Listado de abreviaturas y unidades de medidas

- EC: Enfermedad de Chagas
- UDT: Unidades Discretas de Tipificación
- Tc: *Trypanosoma cruzi*
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, tomado del inglés: *PolimeraseChain Reaction*
- RFLP: *RestrictionFragmentLenghPolymorphism*
- HRM: *High Resolution Melting*
- COII: citocromo oxidasa subunidad II
- HMCOAR: 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
- GPI: Glucosa-6-fosfato isomerasa
- TcMPX: Peroxidasa mitocondrial
- HSP: Proteína de choque térmico, tomado del inglés: *Hot Shock Protein*
- SSU: Subunidad pequeña, tomado del inglés: *small sub unit*
- gGAPDH: gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasaglicosomal
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OPS: Organización Panamericana de la Salud
- ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- RDT: Prueba diagnostic rápida, tomado del inglés: *Rapid Diagnostic Test*
- ADN: Ácido desoxirribonucléico
- ADNk: Ácido desoxirribonucléico del cinetoplasto
- CMIA: Inmunoensayos Magnéticos Quimioluminiscentes
- MINSAP: Ministerio de Salud Pública
- ELAM: Escuela Latinoamericana de Medicina
- U: Unidad
- mM: Mili mol
- μ M: Micro mol
- μ m: Micrómetro
- eq: Equivalentes

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	6
2.1. Objetivo General.....	6
2.2. Objetivos específicos.....	6
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1. Clasificación taxonómica de <i>Trypanosomacruzi</i>	7
3.2. Características morfológicas de los estadios de <i>Trypanosomacruzi</i>	10
3.2.1. Epimastigote.....	10
3.2.2. Tripomastigote.....	10
3.2.3. Amastigote.....	10
3.3. Ciclo de vida.....	11
3.3.1. Vectores de la Enfermedad de Chagas.....	11
3.3.2. Ciclo de vida.....	12
3.3.3. Formas de transmisión.....	14
3.4. Epidemiología.....	16
3.5. Fases, formas y evolución clínica.....	17
3.6. Diagnóstico.....	19
3.6.1. Examen microscópico.....	20
3.6.2. Aislamiento del agente.....	21
3.6.3. Métodos serológicos.....	21
3.6.4. Diagnóstico molecular.....	23
3.6.5. Guía de la Organización Panamericana de la Salud para Diagnóstico de EC.....	24
3.7. Tratamiento.....	26
3.8. Diversidad genética de <i>T. cruzi</i>	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
4.1 Tipo de estudio.....	34
4.2 Universo de trabajo.....	34
4.2.1 Cepas de referencia de <i>Trypanosomaspp</i>	34
4.2.2 Muestras de ADN de otros agentes infecciosos.....	36
4.2.3. Aislamientos del parásito.....	37
4.2.4. Muestras clínicas, vectores y reservorios.....	37
4.3 Normalización de la PCR <i>hsp70</i> UDT.....	37

4.4	Análisis de parámetros analíticos de la PCR <i>hsp70</i> UDT	39
4.4.1	Sensibilidad analítica de la PCR <i>hsp70</i> UDT	39
4.4.2	Especificidad analítica de la PCR <i>hsp70</i> UDT	39
4.5	Evaluación de la utilidad de la PCR-RFLP <i>hsp70</i> UDT	39
4.6	Consideraciones éticas	40
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Normalización de la técnica dePCR-RFLP <i>hsp70</i> para la detección de las UDT de <i>T. cruzi</i> en muestras clínicas, vectores y reservorios.....	43
5.2	Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas de la técnica	45
5.3	Evaluación de la PCR-RFLP <i>hsp70</i> UDT en la diferenciación de <i>T. cruzi</i> en un panel de cepas bien caracterizado.	47
5.4	Detección de las UDT de aislamientos de <i>T. cruzi</i> procedentes de México, Colombia y Bolivia.	49
5.4	Detección de las UDT en muestras biológicas de pacientes con <i>T. cruzi</i> , vectores y reservorios.	50
6	DISCUSIÓN	55
	CONCLUSIONES	67
	RECOMENDACIONES.....	68
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (EC), causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es una zoonosis compleja, ampliamente distribuida en el continente americano. Las infecciones adquiridas fundamentalmente a través de las heces de insectos triatomíneos, constituye la principal vía de transmisión de esta enfermedad (80% de las diferentes vías de transmisión). Sin embargo, otras vías de transmisión incluyen, la transfusión de sangre, el trasplante de órganos y la infección congénita, causas principales de infección en áreas urbanas y en países no endémicos de la enfermedad (Liu y Zhou, 2015; de Fuentes-Vicente 2018). Se suma a estas vías de transmisión los accidentes de laboratorio y en la última década ha retomado especial atención por su importancia epidemiológica la transmisión oral (Yoshida 2009; Rueda et al., 2014; Carlier et al., 2019; Echeverría et al., 2020).

Entre 6 a 7 millones de personas se encuentran infectadas en 21 países endémicos de la región de América Latina (Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, Uruguay, y Venezuela), en estos países se reportan alrededor de 28,000 nuevos casos cada año, con aproximadamente 12,000 muertes y 70 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir esta enfermedad (Lindani et al., 2019; WHO, 2023). Si bien es cierto que la prevalencia de la EC se ha reducido en la última década en los países endémicos, se ha incrementado dramáticamente el número de casos en países no-endémicos, lo que hace de esta enfermedad un problema de salud mundial (Pinazo et al., 2015; Connors et al., 2016; Lindani et al., 2019).

Las migraciones humanas, han constituido un factor crítico para la emergencia de la EC en áreas donde no se había descrito previamente la enfermedad (Connors et al., 2016). Así se han detectado casos en países no-endémicos de América del norte (Estados Unidos y Canadá), Europa (principalmente España), y la región del pacífico (Australia, Nueva Zelanda y Japón), países donde esta entidad se ha convertido en un problema de salud importante, al observarse un número creciente de individuos infectados y cuya transmisión ocurre a través de transfusiones de sangre y trasplantes de órganos de donadores infectados, así como a través de la transmisión congénita de la madre al niño durante el embarazo (Liu y Zhou, 2015; Requena-Méndez et al., 2015; Connors et al., 2016; Antinori et al., 2017; Lindani et al., 2019; Antinori et al., 2022; Iglesias-Rus et al., 2023; Wirth et al., 2023).

El parásito causante de la EC, *T. cruzi*, es un protozoo del phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Está provisto de un flagelo y su única mitocondria contiene el cinetoplasto, una red de ADN extranuclear que corresponde al genoma mitocondrial del parásito, el cual está localizado cerca del cuerpo basal (Rassi 2012; Altcheh y Freilij, 2019). Este parásito constituye un grupo monofilético, pero genéticamente heterogéneo (Tibayrenc, 2010). Basado en el análisis de varios marcadores genéticos y evolutivos y en la interpretación de datos genéticos de la población, se han clasificado las poblaciones de *T. cruzi* en seis unidades discretas de tipificación (UDT), nombradas desde TcI-TcVI (Zingales et al., 2009). Recientemente, un séptimo grupo detectado en murciélagos y denominado TcBat ha sido añadido a esta clasificación (Lima et al., 2015; Zingales, 2018; Zingales y Bartholomer, 2022). La misma es ampliamente utilizada como referencia en estudios epidemiológicos.

Las relaciones evolutivas entre las UDT se entienden parcialmente y, según el número y la naturaleza de los genes analizados, las relaciones entre los mismos cambian, de ahí que se plantee que las relaciones evolutivas entre los UDT, no han sido completamente dilucidadas. Todos los enfoques coinciden en que TcI y TcII permanecen como dos líneas puras que evolucionaron separadamente a partir de un ancestro común que data de aproximadamente 1-3 millones de años. Los linajes TcV y TcVI claramente tienen un origen híbrido con TcII y TcIII como progenitores imputados y los linajes TcIII y TcIV podrían también haberse originado a partir de un híbrido entre TcI y TcII, pero algunos autores no están de acuerdo con estos resultados de ahí que la evolución de estos linajes ha sido un tema de intenso debate. Las relaciones evolutivas entre las diferentes UDT y por consiguiente la historia evolutiva de *T. cruzi* continúa bajo investigación (Brenière et al., 2016).

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 a partir del análisis de 6,343 aislamientos de diferente origen geográfico y hospederos (Santana et al., 2014; Brenière et al., 2016; Zingales, 2018; Zingales y Bartholomer, 2022). De forma general se ha llegado a la conclusión que TcI predominó en la muestra general analizada (alrededor del 60%), tanto en ciclos selváticos como domésticos. Este linaje, conocido por presentar una alta diversidad genética, está ampliamente distribuido geográficamente, compatible con

una evolución a largo plazo. Se cree que el marsupial es su huésped más ancestral y la región del Gran Chaco el lugar de su supuesto origen. La TcII se detectó rara vez en este estudio (9.6%), está ausente o es extremadamente raro en América del Norte y Central, y se identificó con mayor frecuencia en ciclos domésticos que en ciclos selváticos. Tiene una baja diversidad genética y probablemente ha encontrado refugio en algunas especies de mamíferos. Se cree que se originó en el área sur-amazónica. Por su parte los linajes TcIII y TcIV también fueron poco detectados. Mostraron una diversidad genética sustancial y se cree que están compuestos de posibles subgrupos polifiléticos. Incluso aunque se asocian principalmente con ciclos de transmisión selvática, se han informado un total de 150 infecciones humanas con estas UDT. Finalmente, los linajes TcV y TcVI están claramente asociados con los ciclos de transmisión domésticos. Menos del 10% de estas UDT se identificaron juntas en huéspedes selváticos. Una brecha de conocimiento importante en este estudio fue no haber encontrado una asociación entre el genotipo del parásito y la manifestación clínica de la EC en la fase crónica (Brenière et al., 2016). Como consecuencia de las diferencias genotípicas y fenotípicas de las cepas de *T. cruzi* y la distribución geográfica diferencial de las UDT en humanos, si se verificaron variaciones regionales en la sensibilidad de las pruebas serológicas. La resistencia natural al benznidazol y al nifurtimox, verificada *in vivo* e *in vitro* para algunos aislamientos de parásitos, no está asociada con ninguna UDT en particular, y no explica la diferencia marcada en la eficacia antiparasitaria de ambos fármacos en las fases aguda y crónica de la EC (Zingales, 2018; Zingales y Bartholomer, 2022). El amplio debate existente sobre el tema, hace necesario continuar los estudios de detección de UDT en muestras clínicas, vectores y reservorios de países endémicos y no-endémicos de la enfermedad y correlacionar los mismos con las manifestaciones clínicas, la susceptibilidad a los métodos de diagnóstico utilizados y la sensibilidad a los antiparasitarios. Pero para ello es 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.

Diferentes métodos moleculares han permitido la detección y diferenciación de las UDT de *T. cruzi* directamente a partir de muestras clínicas, vectores y reservorios (Cura y Shijman, 2013); en los que se incluyen los métodos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR, siglas del inglés *Polimerase Chain Reaction*)(Souto y Zingales, 1993; Clark y Pung, 1994; Souto et al., 1996; Burgos et al., 2007), la PCR anidada (Bontempi et al.,

2016), la PCR- Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP, siglas del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Westenberger et al., 2005; Freitas et al., 2006; Rozas et al., 2007) y más recientemente la técnica de PCR en tiempo real (Cura et al., 2015; Muñoz-San Martín et al., 2017) y la misma acoplada al análisis de alta resolución de fusión (HRM siglas del inglés *High Resolution Melting*) (Freitas et al., 2005; Higuera et al., 2013).

De la misma forma diferentes blancos genéticos han sido utilizados en los métodos moleculares antes mencionados como son: mini-exon (Burgos et al., 2007), regiones intergénicas para miniexon (SL-IR) (Burgos et al., 2007), subunidad grande ARN ribosomal 24S (Souto y Zingales, 1993; Souto et al., 1996), subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S (Clark y Pung, 1994), fragmento nuclear A10 (A10) (Burgos et al., 2007), citocromo oxidasa subunidad II (COII) (de Freitas et al., 2006), Proteína de unión a GTP similar a Rho (RHO1), 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMCOAR), Glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI), peroxidasa mitocondrial (TcMPX) (Diosque et al., 2014) y los minicírculos del ADN del kinetoplasto (Bontempi et al., 2016).

De forma general se utilizan flujogramas o esquemas de tipificación de secuencias multilocus que combinan un método molecular con diferentes blancos genéticos o juegos de cebadores o tres o más métodos moleculares diferentes, con diferentes blancos genéticos; de los antes mencionados. Con estos se llega a determinar el linaje del parásito a partir de aislamientos o directamente a partir de muestras clínicas de pacientes, vectores y reservorios (D'Ávila et al., 2009; Lewis et al., 2009; Burgos et al., 2010; Diosque et al., 2014; Lima et al., 2014; Cura et al., 2015). Sin embargo, hasta el momento ningún blanco genético único permite la resolución completa de las UDT. De ahí la necesidad de buscar alternativas de detección más sencillas.

Un marcador evolutivo prometedor, la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), se ha demostrado que es útil para el análisis filogenético de varios parásitos como *Cryptosporidium* spp. (Langkjaer et al., 2007; Sulaiman et al., 2000), *Babesia* spp. (Yamasaki et al., 2002, 2007), *Giardia* spp. (Arisue et al., 2002b), *Entamoeba* spp. (Arisue et al., 2002b), *Microsporidium* spp. (Arisue et al., 2002b), *Blastocystis hominis* (Arisue et al., 2002a) y los géneros *Leishmania* (Fraga et al., 2010, 2013, 2021) y *Trypanosoma* (Fraga et al., 2016, 2021). Las proteínas HSP70 están altamente conservadas en procariontes y eucariotes tanto en secuencia como en función, y tienen gran importancia como chaperonas moleculares y

en el plegamiento y transporte de proteínas (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). Son una subfamilia de la familia HSP70 (Folgueira y Requena, 2007), que desempeña un papel importante en las adaptaciones ambientales de los tripanosomas. Los genes de la subfamilia *hsp70* están dispuestos como una matriz de repetición en tándem de forma de cabeza a cola, de los cuales en *T. cruzi* están presentes al menos siete copias (Requena et al., 1988). Este gen ha sido utilizado para la detección e identificación de especies de *Leishmania* en el Viejo y Nuevo Mundo usando la PCR, seguido por análisis del RFLP, que muestran alta sensibilidad y especificidad en muestras clínicas (García et al. 2007; Fraga et al. 2012; Montalvo et al. 2012, 2014, 2017; Veland et al. 2012). De la misma forma este gen se ha utilizado para la detección y diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli*, mediante una PCR dúplex, mostrando una alta sensibilidad y especificidad (Fraga et al., 2014). El análisis filogenético dentro de los aislamientos de *T. cruzi*, basados en este gen, mostró cuatro grupos genéticos, correspondiente a las UDT: TcI, TcIII, TcIV y los UDTsTcII, TcV y TcVI que no forman entidades separadas, este gen se encuentra bajo una selección purificadora que le permite su conservación y preservar la funcionalidad de la proteína, sin embargo, se observan sitios parsimoniosamente informativos que lo hace un marcador molecular apropiado para diseñar métodos moleculares para la detección e identificación de las UDT de *T. cruzi* (Fraga et al., 2016). Teniendo en cuenta estos elementos se propone evaluar la técnica de PCR-RFLP basada en el gen *hsp70* para la detección de las UDT de *T. cruzi* (PCR-RFLP_{*hsp70*} UDT), empleando cebadores previamente diseñados (Fraga et al., 2016) con estos fines.

2. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

2.1. Objetivo General

Evaluar la utilidad de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* en la detección de las UDT de *T. cruzi* en muestras clínicas, vectores y reservorios.

2.2. Objetivos específicos

- Normalizar la técnica de la PCR *hsp70*.
- Determinar la sensibilidad y especificidad analíticas de la técnica.
- Demostrar la utilidad de la PCR-RFLP *hsp70* en la tipificación de un panel de cepas de referencia de *T. cruzi* y determinar sus linajes a partir de aislamientos parasitarios.
- Identificar las UDT mediante la técnica de la PCR-RFLP *hsp70* en muestras clínicas, vectores y reservorios.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*

El agente causal de la enfermedad de Chagas es *T. cruzi* cuya ubicación sistemática es la siguiente (Levine et al., 1980; Schochet al., 2020):

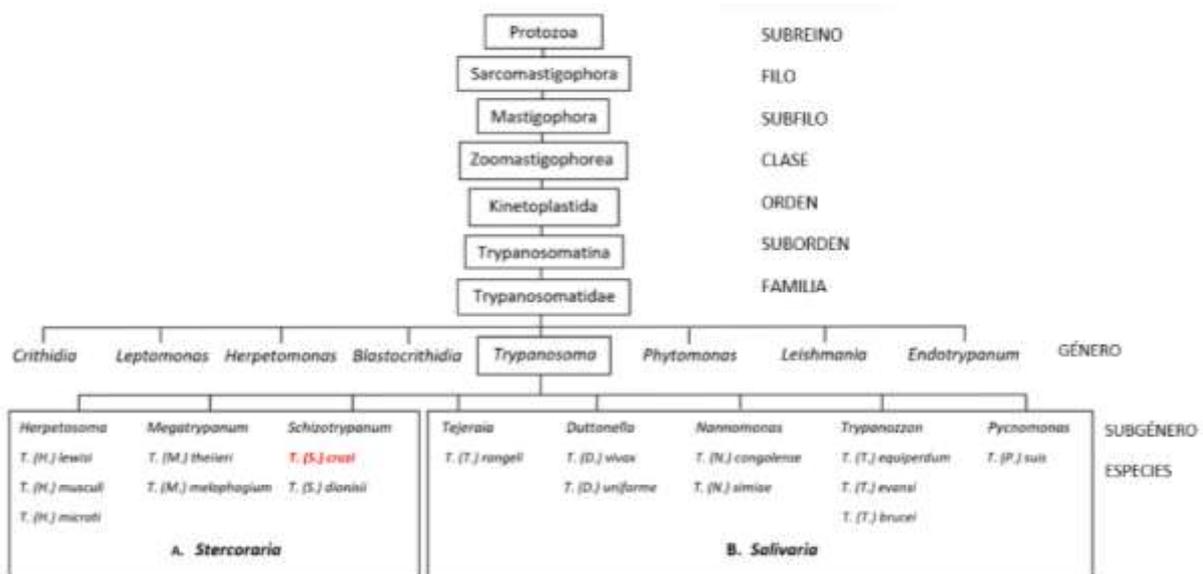


Figura. 1. Clasificación de tripanosomas en mamíferos. Editada a partir del texto Altchehy Freilij, 2019.

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes, por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de EC, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño en el hombre y *T. brucei brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*, que causan la enfermedad en animales.

El género *Trypanosoma* se considera un grupo monofilético, compartiendo un ancestro común que data de hace unos 100 millones de años (Barrett et al., 2003; Stevens y Gibson, 1999). La clasificación establecida por Hoare se basó en la morfología y el desarrollo en el vector (Hoare, 1972). Las especies de *Trypanosoma* que infectan mamíferos se separaron en dos secciones: Salivaria y Stercoraria. Los tripanosomas de la sección Salivaria se subdividieron en cinco subgéneros: *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas*, *Tejeraia* y *Pycnomonas*. La división Stercoraria comprendía tres subgéneros: *Schizotrypanum*,

Megatrypanum y Herpetosoma (Vickerman, 1976; AltchehyFreilij, 2019). Como algunos de estos grupos son polifiléticos y carecen de relevancia evolutiva y taxonómica, algunos autores han sugerido, más recientemente, clasificar el género en clados filogenéticos, basado en el análisis de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU-rRNA) y la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa glicosomal (gGAPDH) (Simpson et al., 2006; Stevens, 2008; Stevens y Gibson, 1999; Stevens y Rambaut, 2001). A pesar de la información proporcionada por el análisis de secuencia de ADN, la filogenia del género *Trypanosoma* y sus relaciones evolutivas no han sido firmemente establecidas (Hughes y Piontkivska, 2003; Kelly et al., 2014; Votýpka et al., 2015). Recientemente, Fraga y colaboradores (2016, 2021) realizaron el análisis filogenético del género *Trypanosoma* basado en el análisis de las secuencias del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), el estudio combinado con otros marcadores genéticos. Este estudio apoyó la clasificación de las especies de *Trypanosoma* en clados en lugar de en secciones y subgéneros. Se reconocieron nueve clados: *Trypanosoma carassi*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. grayi*, *T. lewisi*, *T. rangeli*, *T. theileri*, *T. vivax* y *Trypanozoon* (Figura 1). Estos resultados resultaron consistentes con el conocimiento existente de la filogenia del género.

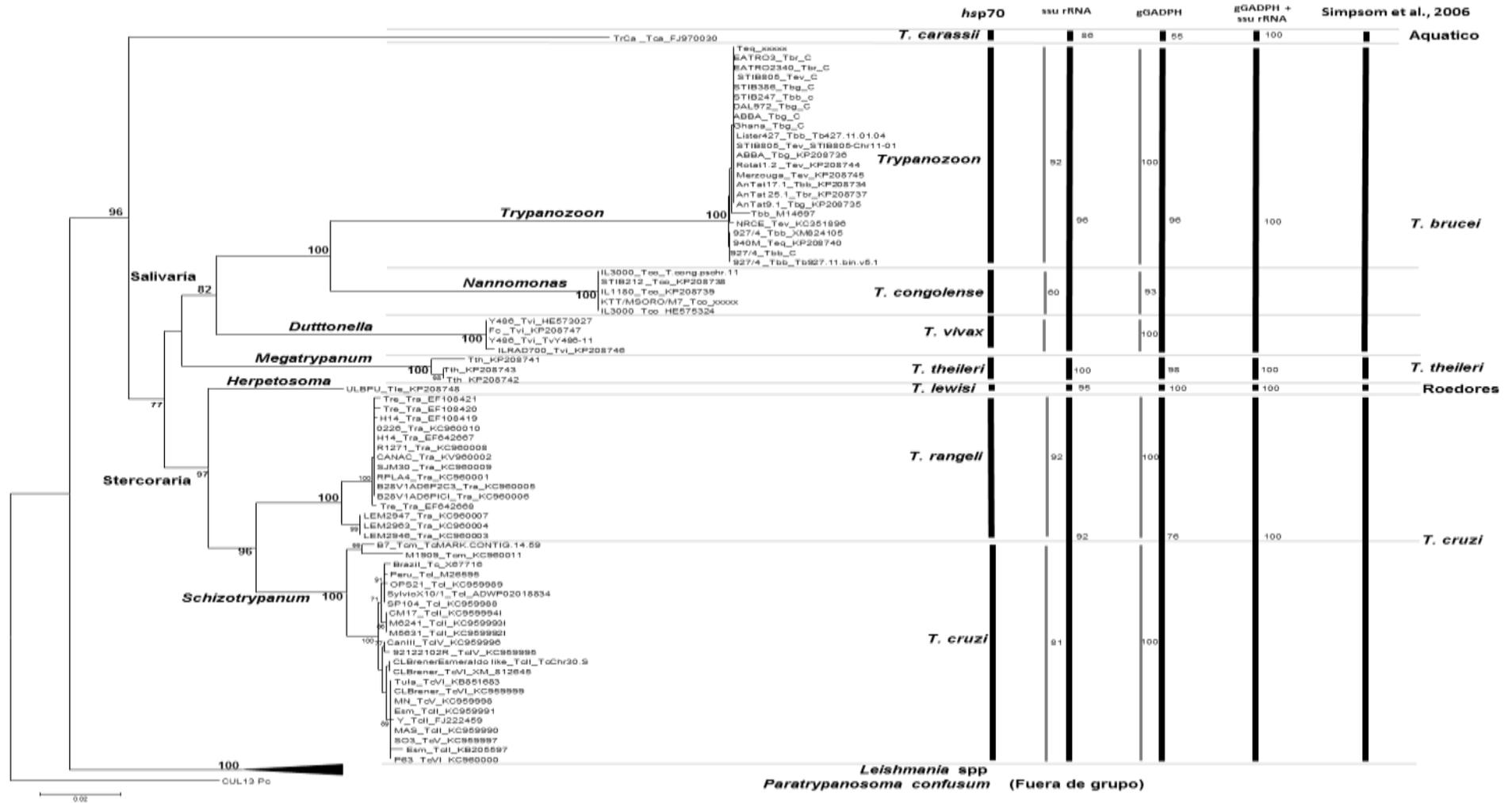


Figura 2. Filogenia de unión al vecino de las secuencias de nucleótidos *hsp70* que pertenecen a 11 especies de *Trypanosoma*. Las distancias se estimaron utilizando el modelo Kimura de 2 parámetros. Bootstrap se infirió a partir de 2000 repeticiones, y se da en porcentajes en los entrenudos cuando excede el 70% (primer valor). Para comparación, también los valores de arranque de los árboles de máxima parsimonia y máxima verosimilitud se muestran para cada grupo respectivo (segundo y tercer valor, respectivamente). El árbol se enraizó con las secuencias de *Paratrypanosoma confusum* y *Leishmania* spp. (*L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. garnhami*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. lainsoni*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. naiffi*). Los nombres en las ramas representan el clasificación subgénero clásica de Hoare (1972). Las secciones de Stercoraria y Salivaria están indicadas a la izquierda. Los Clados propuestos por Simpson et al. (2006) y grupos monofiléticos de otros informes están representados a la derecha por líneas verticales, para SSU-rDNA (Cavazzana et al., 2010; Stevens y Gibson, 1999); gGADPH (Hamilton et al., 2004); y SSUrDNA + gGADPH (Lima et al., 2013).

3.2. Características morfológicas de los estadios de *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi presenta tres estadios distinguibles fácilmente por microscopía de campo claro según las características del flagelo y la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo celular (Brenner, 1973). A continuación, los describimos brevemente.

3.2.1. Epimastigote.

Es la forma flagelada replicativa y no infectiva que se encuentra en el intestino medio del insecto vector. Posee forma ahusada, un tamaño de 20 - 40 x 2 μm y el núcleo es redondeado. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el kinetoplasto es anterior al núcleo celular. Se divide por fisión binaria y a diferencia de los demás estadios, puede cultivarse en medio axénico (Figura 3A).

3.2.2. Tripomastigote.

Es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospederos (Figura 3B y D). Es de forma elongada y mide aproximadamente 20 μm de longitud. Posee una membrana ondulante en uno de sus lados, el flagelo emerge del extremo apical posterior, su núcleo es alargado y el kinetoplasto se encuentra ubicado posterior al mismo. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero, y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en el insecto, que son las formas infectivas. Los tripomastigotes sanguíneos y los tripomastigotes metacíclicos tienen forma similar, y comparten algunas propiedades biológicas. Sin embargo, los tripomastigotes sanguíneos poseen la capacidad de transformarse en epimastigotes a 27 °C en sangre o medio axénico, propiedad que está ausente en los metacíclicos. Además, ambas formas del parásito poseen antígenos estadio específicos y presentan diferentes modos de interaccionar con las células hospederas (Paba et al., 2004).

3.2.3. Amastigote.

Es la forma no flagelada, esférica u ovalada (2-4 μm), que se localiza intracelularmente en vacuolas acídicas y que es replicativa en el citoplasma del mamífero hospedero (Ley et al., 1990) (Figura 3C).

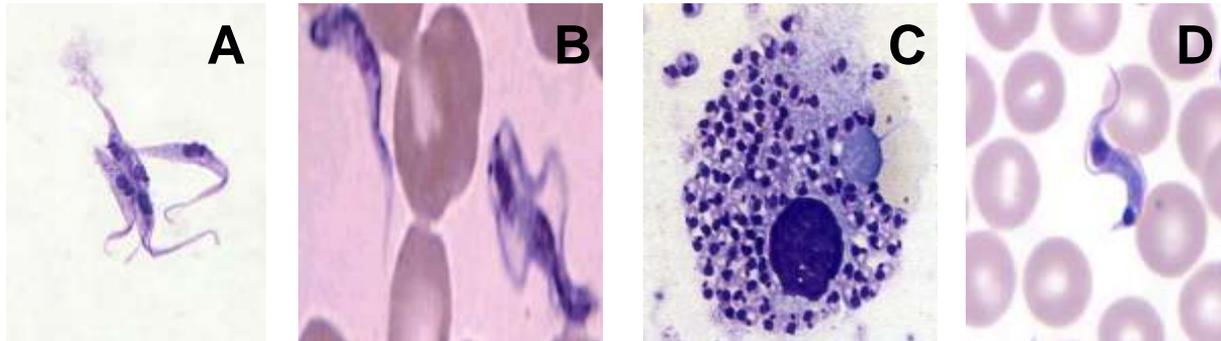


Figura 3. Estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. A) Epimastigotes, B) Tripomastigote metacíclico, C) Amastigotes en el interior de una célula muscular, D) Tripomastigote sanguíneo en sangre periférica. Tomado de CDC, 2019.

3.3. Aspectos biológicos, clínicos, epidemiológicos, diagnósticos y terapéuticos de la EC.

El ciclo de vida de *T. cruzi* requiere normalmente de dos hospederos: un insecto capaz de producir formas metacíclicas (hospedero invertebrado) y un mamífero (hospedero vertebrado). Los hospederos vertebrados lo constituyen los seres humanos y más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos y cobayos) y animales silvestres (roedores, marsupiales y armadillos).

3.3.1. Vectores de la Enfermedad de Chagas.

El hospedero invertebrado lo constituyen insectos hematófagos pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, los que se infectan a través de la succión de sangre de mamíferos con tripomastigotes infectados dentro de tres ciclos que se solapan: doméstico, peridoméstico y silvestre y estos a su vez infectan al hospedero vertebrado a través de las heces eliminadas por el vector infectado en el momento de alimentarse (Brenner, 1985). La subfamilia Triatominae se compone actualmente de 151 especies descritas (149 existentes y dos fósiles), asignadas a cinco tribus (Justi y Galvão, 2017, Carbajal de la Fuente et al., 2022).

Las dos tribus de Triatominaes más estudiadas, Triatomini y Rhodniini, son comprensiblemente las más abundantes ("más fáciles de encontrar") y también las más

diversas ("especies más descritas"). Se ha demostrado que ambas tribus son monofiléticas construido en base a la morfología, antes que los datos de secuencia de ADN estuvieran disponibles, sin embargo, los nuevos datos filogenéticos basados en ADN muestran que los géneros dentro de cada grupo no lo son (Justi y Galvão, 2017).

Aunque las especies de triatomas se han identificado y se consideran potencialmente capaces de transmitir el parásito, solo un grupo de ellas se ha demostrado como vectores de la enfermedad. La capacidad vectorial de una especie dada de *Triatoma* depende de su grado de asociación con los humanos. La mayoría de los triatomíneos presentan hábitats silvestres, transmitiendo el parásito a los huéspedes asociados con el hábitat silvestre. Sin embargo, al menos 10 especies son consideradas poblaciones estrictamente domésticas principalmente en América Latina, mientras que al menos 20 especies son consideradas vectores secundarios al invadir las casas de los hábitats peridomésticos (Vallejo et al., 2009; Carbajal de la Fuente et al., 2022; de Pavia et al., 2022). Los principales vectores domésticos en los países endémicos son: *Triatoma infestans* (Fig. 4a), *Panstrongylus megistus* (Fig. 4b), *Rhodnius prolixus* (Fig. 4c) y *Triatoma dimidiata* (Fig. 4d) debido a que son aquellas especies que adquirieron hábitos domiciliarios (Otálora-Luna et al., 2015) y tendencias antropofílicas (Telleria and Tibayrenc, 2017) (Figura 4).

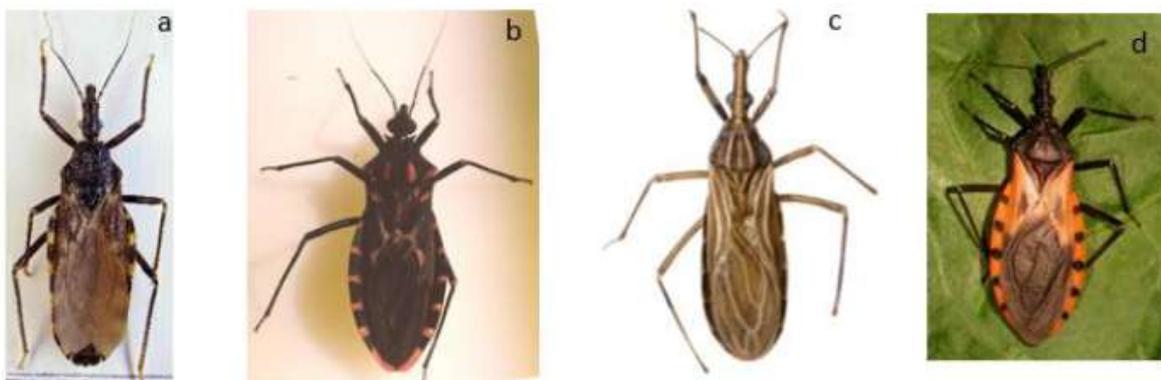


Figura 4. Principales especies de triatomíneos transmisores de Chagas al ser humano: a) *Triatoma infestans*, b) *Panstrongylus megistus*, c) *Rhodnius prolixus*, d) *Triatoma dimidiata*. Tomado de Carbajal de la Fuente et al., 2022.

3.3.2. Ciclo de vida.

Este ciclo comienza cuando el insecto vector se alimenta con la sangre del hospedero mamífero y luego defeca sobre la zona afectada. Los tripomastigotes metacíclicos contenidos en las heces del triatomíneo penetran a través de la piel lesionada, pasan al

torrente sanguíneo e invaden un amplio rango de células nucleadas (Tyler y Engman, 2001). Una vez en el citoplasma de la célula, el tripomastigote comienza a sufrir el proceso de diferenciación a amastigote: su flagelo se acorta y se hace casi inexistente y el cuerpo y el núcleo vuelven a tomar forma redondeada. Unas 24 a 35 horas después de su entrada al citosol, el amastigote comienza a dividirse activamente por fisión binaria y llega a formar pseudo-quistes dentro de la célula. Cuando ya existe una alta densidad de parásitos intracelulares, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que salen de la célula infectada, pasan a la sangre o a la linfa del mamífero y pueden invadir nuevas células (Tyler y Engman, 2001; Burleigh y Woolsey, 2002). El ciclo de vida del parásito se cierra cuando el insecto vector se alimenta con la sangre de un mamífero infectado. Dicha sangre contiene tripomastigotes sanguíneos que, al llegar al intestino del triatomíneo se diferencian a epimastigotes. Los tripomastigotes metacíclicos por su parte, provienen de la diferenciación de epimastigotes. Cuando estos llegan al recto del insecto vector, se adhieren a través de su flagelo mediante interacciones hidrofóbicas a la cutícula de la pared intestinal. Finalmente se despegan de la pared intestinal y son eliminados en las heces del vector (Brener, 1971; Tyler y Engman, 2001; Rassi et al., 2009, Texeira et al., 2012) (Figura 5).

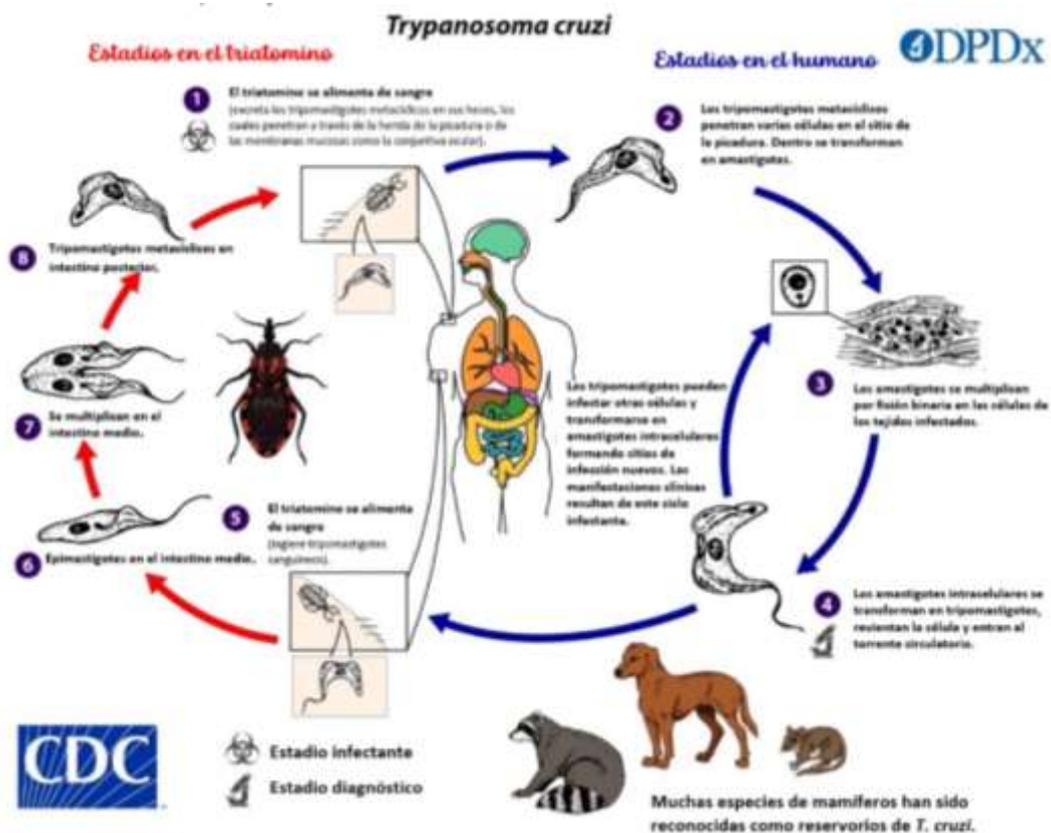


Figura 5. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado de CDC, 2019.

3.3.3. Formas de transmisión.

Además de la principal vía de transmisión de *T. cruzi* que es la propagación vectorial (de Fuentes-Vicente et al., 2018), este parásito puede transmitirse a través de otras rutas entre las que se encuentran la sanguínea, congénita, trasplante de órganos, oral y accidentes de laboratorio. Estas tienen un papel importante en los países no endémicos y una importancia creciente en las áreas endémicas.

La transmisión madre a hijo es actualmente el principal modo de transmisión de *T. cruzi* por encima de transfusiones de sangre y trasplantes de órganos en áreas libres de vectores dentro y fuera de América (Carlier et al., 2019; Echevarria et al., 2020). La OMS estima que 1.125.000 mujeres en edad fértil están infectadas con *T. cruzi* en América Latina, con una incidencia de infección congénita de 8,668 casos/año (Carlier et al., 2019). Se estima que la tasa de transmisión de madre a hijo es del 4,7% (rango 3,9-5,6%) y que esta tasa podría ser mayor en países endémicos que en países no endémicos (5% vs 2,7 %) (Bern et al., 2009; Murcia et al., 2013; Howard et al., 2014; Luquetti et al., 2015; Carlier et al., 2019; Chancey et al., 2023). El principal determinante biológico para la transmisión congénita es la parasitemia, que podría ser tan alta como 31% cuando *T. cruzi* es detectable por PCR, aunque la transmisión también es posible cuando la PCR es negativa (Bua et al., 2012; Murcia et al., 2013). La infección congénita por *T. cruzi* es una infección aguda en recién nacidos que debe tratarse con terapia antiparasitaria. Si no se trata, la infección puede progresar a EC crónica más adelante en la vida, con una caída en la tasa de curación (Carlier et al., 2019).

Trypanosoma cruzi también puede ser transmitido a través de sangre y productos sanguíneos; esta constituye una causa frecuente de transmisión de la enfermedad después de la transmisión vectorial; la tasa de transmisión estimada por unidad de sangre infectada es del 10-25% (Bern Y Montgomery, 2008; Cancino-Faure et al., 2015). Su riesgo radica en que puede extenderse más allá de las áreas endémicas, debido a la migración de latinoamericanos hacia países de Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía. Aunque se desconocen las cifras concretas, en los países europeos se estima que alrededor del 2 %

de los inmigrantes latinos están infectados con *T. cruzi* y que podrían actuar como donadores de sangre (Gascón et al., 2010). En Estados Unidos, se han documentado cinco casos de infección por *T. cruzi* asociados a transfusiones de sangre desde la década de los ochenta, y entre 2006 y 2011 se reportaron 1.459 donaciones seropositivas para *T. cruzi*. Con la tamización en bancos de sangre en Latinoamérica desde 1993, se ha disminuido la prevalencia de la infección por transfusiones (Schmunis y Yadon, 2010).

Los candidatos a trasplante y los donantes con infección crónica por *T. cruzi* tienen riesgo de reactivación de la enfermedad de Chagas y transmisión de la infección (La Hoz, 2022). Las tasas de infección después del trasplante de órganos sólidos de un donante infectado parecen ser más bajas para los receptores de riñón (0-19%) (Riarte et al., 1999; Huprikar et al., 2013; Cicora et al., 2014) que para los receptores de hígado (0-29%) (Chin-Hong et al., 2011; Huprikar et al., 2013) y los receptores de corazón (75-100%) (Kun et al., 2009; Huprikar et al., 2013). Los receptores con infección crónica y los que reciben órganos de donantes infectados deben someterse a un seguimiento secuencial con PCR para la detección precoz de la reactivación y tratamiento preventivo con terapia tripanocida (La Hoz, 2022).

La infección oral después de un período de latencia de 3 a 22 días después de la ingestión se caracteriza por manifestaciones más graves que las asociadas con la transmisión vectorial: fiebre prolongada, miocarditis aguda con insuficiencia cardíaca y, en algunos casos, meningoencefalitis. La mortalidad puede alcanzar hasta el 33% de los infectados (Filigheddu et al., 2017). Está asociada al consumo de carne de animales salvajes (que actúan como reservorios de la enfermedad) y zumos o jugos de fruta caseros o artesanales (jugo de caña de azúcar, el açai, el jugo de açai, el agua contaminada, el jugo de palmito y el jugo de guayaba). Las principales localidades afectadas han sido Brasil, Pará, Amapá y Amazonas, y otros países latinoamericanos como Guayana Francesa y Venezuela (Pacheco et al., 2021). Se suele dar en forma de brote y tiene mayor morbimortalidad, ya que se adquiere mayor carga parasitaria. La principal especie transmisora por esta vía es *Panstrongylus geniculatus*, que no es buen transmisor vía vectorial porque no defeca a la vez que se alimenta (Vivas et al., 2021). Otro modo de transmisión menos frecuente incluye accidentes de laboratorio (Herwaldt, 2001).

3.4. Epidemiología

La tripanosomiasis americana es endémica en 21 países continentales de América Latina, desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile (figura 6). Según las últimas estimaciones realizadas por la OMS, entre 6 a 7 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* fundamentalmente en los países endémicos de América Latina y hay unos 70 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2023). De manera global, el 13% de toda la población latinoamericana está en condiciones de riesgo de adquirir la enfermedad. Tradicionalmente, está confinado a las zonas rurales pobres de América Central y del Sur, donde la transmisión vectorial es la principal vía de contagio. Los residentes de casas infestadas están continuamente expuestos a picaduras de vectores, y la incidencia de infección por *T. cruzi* es inferior al 0,1% y puede llegar hasta el 4% anual en regiones hiperendémicas como el Chaco boliviano (Samuels et al., 2013). Las mayores tasas de prevalencia se han reportado en Bolivia (6,75–15,4 %), seguida de Paraguay (0,69–9,3 %) y Panamá (0,01–9,02 %). Sin embargo, el número total de casos en Brasil (0,8–1,30 %), México (0,5–6,8 %), y Argentina (4,13–8,2 %), en conjunto representan el 60 % de todas las personas infectadas con *T. cruzi* en América Latina (Liu y Zhou, 2015).

Desde comienzos de la década de 1990, las medidas más eficaces para el control de la enfermedad de Chagas en América Latina son los programas de control de vectores y las pruebas obligatorias en bancos de sangre (Yamagata y Nakagawa, 2006). Por consiguiente, la prevalencia ha disminuido sustancialmente y la transmisión vectorial fue interrumpida en Uruguay en el año 1997, en Chile en el año 1999, y en la mayor parte de Brasil en 2000 (Salvatella et al., 2014). Sin embargo, la frecuencia de transmisión ha aumentado en regiones como la cuenca amazónica (transmisión oral) (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012) y algunas áreas del Gran Chaco Boliviano (debido a la resistencia del vector a los piretroides) (Gurevitz et al., 2013).

Desde hace algunos años, la situación epidemiológica se complica con la entrada de inmigrantes procedentes de regiones endémicas a muchos países de Europa, el Pacífico occidental, Estados Unidos y Canadá, donde esta enfermedad se ha vuelto un problema de salud importante, al observarse un número creciente de individuos infectados (Schmunis, 2007; Guerri-Guttenberget et al., 2008; Bern y Montgomery, 2009; Gascón et al., 2010; Martínez et al, 2013; Pinto et al., 2014; Antinori et al., 2022; Gómez-Ochoa et al., 2022; Iglesias-Rodríguez et al., 2022; Navarro et al., 2022; Iglesias-Rus et al., 2023; Wirth et

al.,2023). EC ha cruzado las fronteras internacionales y ahora es una epidemia global, en la medida en que puede transmitirse a regiones no endémicas. La prevalencia combinada de la infección en los migrantes latinoamericanos que viven en Europa se estima en un 4,2% (IC del 95% 2,2-6,7), con la mayor prevalencia entre migrantes de Bolivia (18,1%) y Paraguay (5,5%) (Requena-Méndez et al., 2015; Navarro et al., 2022; Iglesias-Rus et al., 2023). En los Estados Unidos se estima 288.000 personas infectadas, incluidos 57.000 pacientes con cardiomiopatía chagásica y 43.000 mujeres en edad reproductiva infectadas (Irish et al., 2022).

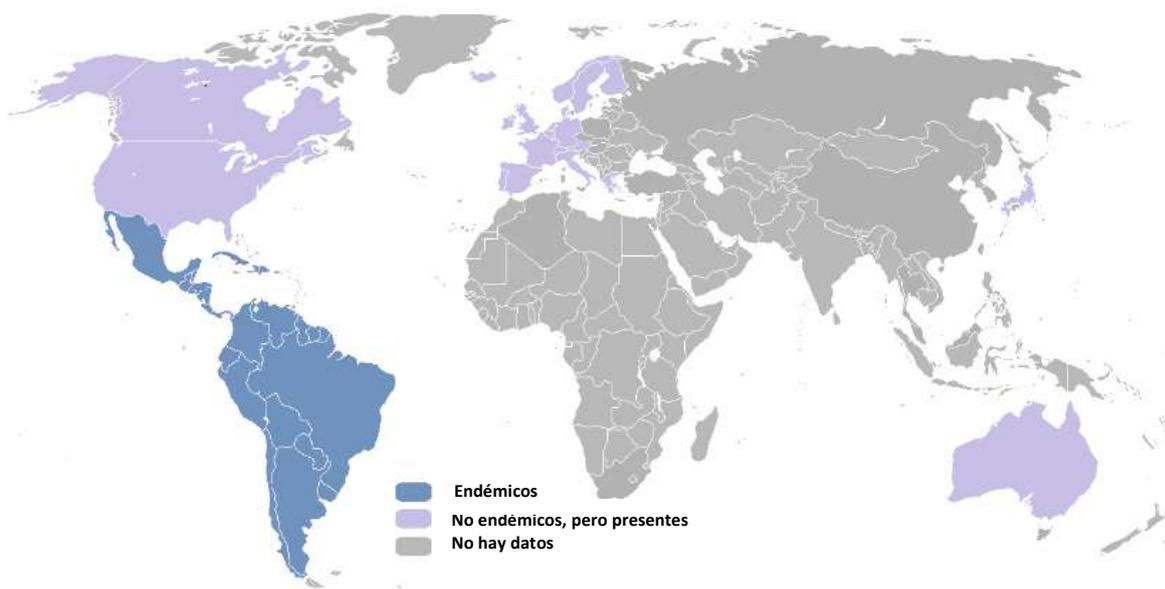


Figura 6. Distribución global que muestra los países endémicos para la enfermedad de Chagas, donde la transmisión ocurre principalmente por la acción de los insectos vectores, así como los países que reciben personas infectadas de estas regiones debido al proceso migratorio. Tomado de Sangenito et al., 2020.

3.5. Fases, formas y evolución clínica.

La infección humana por *T. cruzi* presenta un período de incubación que varía en dependencia de la forma de transmisión. La forma vectorial entre 5 y 14 días, la oral 5 días, la transfusional entre 30 y 110 días, la congénita entre 4 y 9 meses (Lescure et al., 2010). Posteriormente, sobreviene la fase aguda que usualmente es asintomática o puede presentarse como una enfermedad febril auto limitada donde la parasitemia es relativamente alta. En esta fase puede presentarse la aparición de una pequeña lesión en el sitio de la picadura denominada chagoma de inoculación, que, si está a nivel de la

conjuntiva, puede producir un edema duro bpalpebral unilateral, con dacrioadenitis e inflamación del gangliopreauricular denominado signo de Romaña. Las manifestaciones de la enfermedad aguda se resuelven de manera espontánea en el 90 % de los individuos infectados, aun cuando la infección no sea tratada. La fase aguda dura 4-8 semanas, y la parasitemia disminuye sustancialmente de 90 días en adelante. Aun así, la enfermedad aguda grave ocurre en menos de 1-5% de los pacientes e incluye manifestaciones tales como miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis. En esta fase las muertes ocurren ocasionalmente, como resultado de miocarditis severa, meningoencefalitis o ambas (< 5- 10% de los casos sintomáticos; 0,2-0,5%) (Rassi et al., 2010). La mayoría de los recién nacidos con infección congénita son asintomáticos o tienen síntomas leves, pero una minoría tiene una enfermedad grave que amenaza la vida (Bittencourt et al., 1975). La transmisión oral a través de alimentos o bebida contaminada con heces de triatomíneos parece causar una enfermedad más grave, con una mayor mortalidad que las enfermedades transmitidas por vectores (ShikanaiYasuda et al., 2013). El tratamiento con la droga antiparasitaria puede usualmente curar la infección aguda y prevenir las manifestaciones crónicas (50-80 % de los casos) (Pinto et al., 2009; Rassi et al., 2010).

Seguidamente los pacientes pasan a una forma crónica indeterminada de la enfermedad, la cual se caracteriza por la positividad de anticuerpos contra el parásito y resultados normales de electrocardiogramas y exámenes radiológicos de tórax, colon y esófago. En esta fase el tratamiento con fármacos antiparasitarios puede usualmente curar la infección entre un 20 a un 60 % de los casos (Rassi et al., 2010). Alrededor del 60 al 70 % de los pacientes en esta fase nunca desarrollan clínicamente la enfermedad y por lo tanto son el grupo más grande de pacientes afectado. El resto de los pacientes (30- 40 %) desarrollan la forma determinada de la fase crónica caracterizada por una forma cardíaca, digestiva (megaesófago y megacolon) o cardiodigestiva entre 10 a 30 años después de iniciada la infección provocando la muerte del paciente (Dias, 1995). Los resultados de estudios recientes han demostrado una progresión a la afectación cardíaca de alrededor de 1,4-5,0% por año (Machado-de-Assis et al., 2013). La afectación cardíaca es el tipo más frecuente y grave de afectación de órganos, ocurre en el 14-45% de los pacientes infectados crónicamente (Salvador et al., 2014) y afecta principalmente el sistema de conducción del impulso nervioso y el miocardio. La afectación gastrointestinal es menos frecuente (10-21%) y ocurre con mayor periodicidad en el Cono Sur de Sudamérica (Salvador et al., 2014). En esta fase el tratamiento con drogas antiparasitarias

(benznidazol) tiene resultados de cura mucho menores que en el caso de la forma indeterminada (Rassi et al., 2010) (Figura 7).

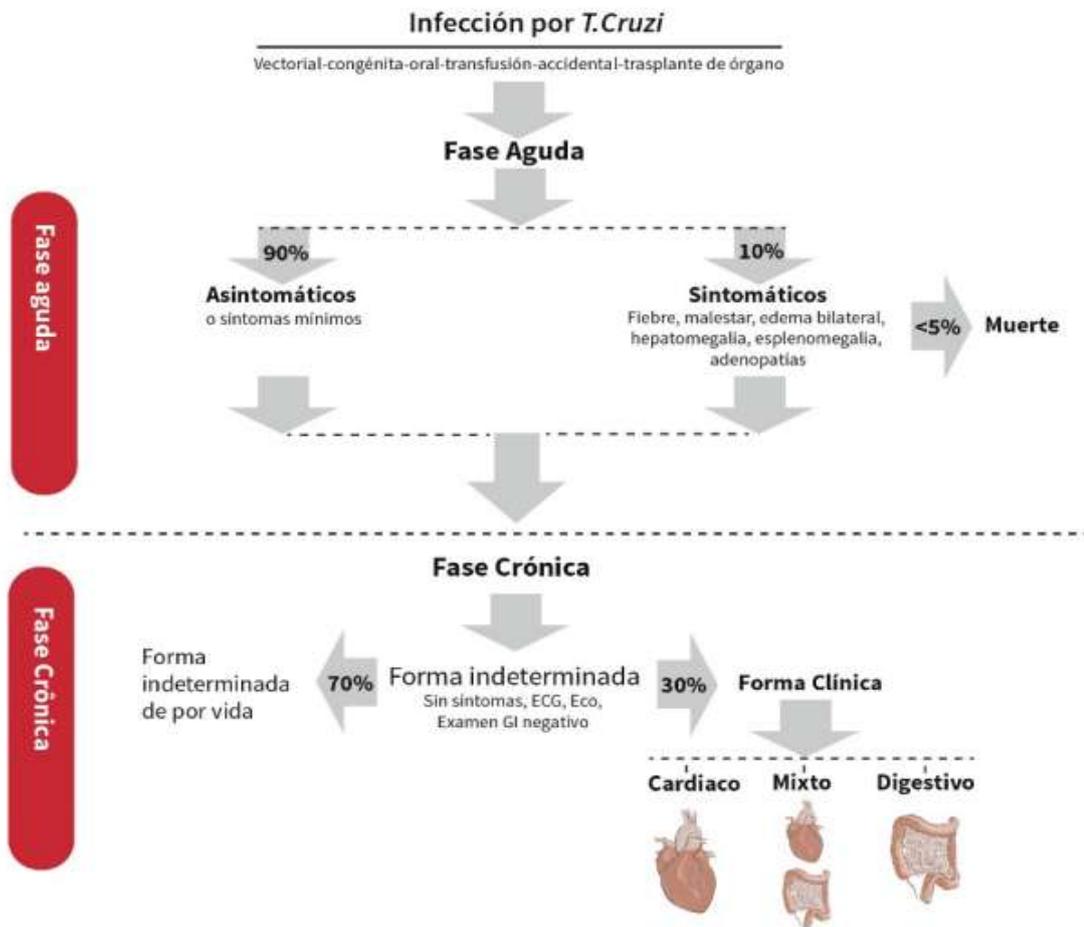


Figura 7. Historia natural y fases de la Enfermedad de Chagas en el humano. Tomado de Echevarría et al., 2020.

3.6. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* depende de la fase de la enfermedad y se debe apoyar en la información tanto epidemiológica como clínica del paciente, así como en las pruebas de laboratorio (Lescure et al., 2010; Rassi et al., 2010; Candia-Puma et al., 2022). En la fase aguda y en la enfermedad congénita de EC el diagnóstico de laboratorio se basa en la observación del parásito presente en la sangre de los individuos infectados dada la constante presencia del parásito en esa etapa.

En la fase crónica de la enfermedad, indeterminada o determinada, el diagnóstico parasitológico directo resulta comprometido por la baja e intermitente parasitemia. Los métodos parasitológicos indirectos (xenodiagnóstico o hemocultivo) que pueden ser utilizados, presentan baja sensibilidad (de 20 a 50%). De esta forma, el diagnóstico en la fase crónica es esencialmente serológico.

No hay consenso sobre los algoritmos de diagnóstico para muchos escenarios de infección por *T. cruzi*, lo que dificulta el establecimiento de directrices gubernamentales en países endémicos y no endémicos. En la fase aguda, se emplean actualmente los métodos parasitológicos, y se están introduciendo pruebas moleculares estandarizadas para proporcionar una mayor sensibilidad y menos dependencia del operador. En la fase crónica, actualmente se utilizan ensayos serológicos basados en IgG, pero si un solo ensayo no alcanza la precisión requerida, la OPS/OMS recomienda al menos dos pruebas inmunológicas con principios técnicos diferentes. Se aplican algoritmos específicos para diagnosticar infecciones congénitas, examinar donantes de sangre y órganos o realizar estudios epidemiológicos. La detección de la reactivación de la enfermedad de Chagas en individuos inmunodeprimidos es un área de creciente interés (Schijman et al., 2022).

3.6.1. Examen microscópico

Las pruebas parasitológicas directas utilizadas son el examen de sangre fresca, frotis y gota gruesa. Los parásitos se pueden observar a través de un examen de sangre fresco simple o en frotis de sangre delgados y gruesos coloreados con Giemsa (sensibilidad 34–85%). Si estas pruebas fueran negativas, deben ser usados métodos de concentración. Las pruebas de concentración (microhematocrito o *Strout*) presentan de 80 a 90% de positividad y son recomendados en el caso de fuerte sospecha de EC aguda y negatividad de la prueba directa con sangre fresca (Lescure et al., 2010). *T. cruzi* se puede encontrar en el corazón, en las células del músculo liso o de los músculos esqueléticos y en las células gliales del sistema nervioso, a veces también en los chagomas. En los pacientes inmunodeprimidos, los parásitos también se pueden detectar en zonas atípicas como el líquido pericárdico, médula ósea, cerebro, piel y los ganglios linfáticos. Es mucho más probable que la parasitemia activa se manifieste durante la fase aguda que durante la fase crónica. Se pueden examinar frotis de sangre gruesos o finos, pero la morfología del parásito es más clara en los frotis finos (Molina et al., 2016; Pérez-Molina y Molina, 2018).

3.6.2. Aislamiento del agente

Trypanosoma cruzi se puede cultivar a partir de tejidos o muestras de sangre heparinizadas. Se pueden utilizar diversos medios especializados que incluyen medio de infusión de hígado y triptosa o medio de Novy-MacNeal-Nicolle, además de las líneas celulares Vero. El cultivo puede demorar entre 1 y 6 meses. El agente también se puede aislar al inocular la sangre en un cobayo, ratón o una rata; este procedimiento es con frecuencia exitoso en casos crónicos. El xenodiagnóstico se considera la prueba de oro cuando está disponible. En este procedimiento, se permite que los insectos triatomíneos de laboratorio libres de *T. cruzi* se alimenten de una persona infectada; los parásitos se pueden encontrar en el contenido intestinal del insecto entre 1 y 2 meses más tarde. Debido a que estos métodos de diagnóstico son lentos, exigen un trabajo intensivo y requieren personal altamente capacitado, por lo general se utilizan únicamente para confirmar un diagnóstico, si otras pruebas quedan inconclusas, en investigación, o para aislar cepas de parásitos (Molina et al., 2016; Pérez-Molina y Molina, 2018).

3.6.3. Métodos serológicos

Las técnicas serológicas se basan en el uso de antígenos obtenidos de parásitos enteros y extractos purificados (pruebas convencionales) y en antígenos recombinantes y péptidos sintéticos (pruebas no convencionales). Las técnicas más comunes utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemaglutinación indirecta (HAI) y el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA (Gomes et al., 2009; Candia-Puma et al., 2022). En un meta-análisis realizado por Candia-Puma y colaboradores (2022), la técnica de IFI mostró una sensibilidad promedio de 78 % (74-78%) y una especificidad de 99 % (83-100%), por su parte la HAI mostró valores de sensibilidad promedio de 75 % (53-99%) y especificidad promedio de 99% (92-100%), mientras que las técnicas de ELISA mostraron una sensibilidad y especificidad promedio de 99% (Sensibilidad 78-88%, Especificidad 83-100%). Más recientemente se han ido incorporando las pruebas de diagnóstico rápido (RDT, por sus siglas en inglés) las cuales son fáciles de usar y requieren técnicamente menos tiempo que las técnicas serológicas clásicas. Sorprendentemente, muchas de ellas se pueden realizar en suero o con un volumen muy pequeño de sangre entera, y se pueden almacenar por más de un año. Su uso a gran escala podría contribuir a un mayor acceso al diagnóstico, un mejor tratamiento-cobertura y una reducción de la transmisión de

enfermedades. Sin embargo, a pesar de haber sido comúnmente utilizado para las encuestas de campo, la OMS no recomienda las RDT (Angheben et al., 2019). Globalmente, un meta-análisis realizado por Angheben y colaboradores (2019) mostró que la sensibilidad de las RDT examinadas fue buena (superior al 95 %; rango 91,3- 98,7%) y la especificidad fue excelente (>99%; rango 98,24-99,70%), independientemente de su uso en regiones endémicas o no endémicas.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS)/OMS recomienda considerar positivos a EC a aquellos individuos que tienen dos pruebas serológicas positivas. Este diagnóstico debe ser realizado utilizando dos pruebas serológicas de principios metodológicos diferentes y antígenos diferentes (Bern et al., 2007; Apt et al., 2008; OPS, 2020). Los resultados serológicos pueden ser discordantes y las muestras pueden dar resultados persistentes y no concluyentes (3% en un laboratorio clínico general). A continuación, se indica un tercer ensayo para aclarar el estado de la infección. Técnicas como la transferencia de Western Blot pueden resultar útiles en estas circunstancias, especialmente en países donde las especies de *Leishmania* son endémicas (Riera et al., 2012). Dada la alta sensibilidad y la especificidad del ELISA, una sola prueba puede ser suficiente para el cribado, por lo que la confirmación serológica sólo es necesaria en el caso de un resultado positivo (Brasil et al., 2010). Las pruebas diagnósticas rápidas (por ejemplo, ensayos inmunocromatográficos que utilizan proteínas recombinantes) no son lo suficientemente sensibles para ser utilizadas como primera prueba, sin embargo, estas pruebas y el uso de muestras de sangre seca son una buena opción para los pacientes que tienen dificultades para acceder a los centros de salud o cuando se necesita tamizaje a gran escala (Sanchez-Camargo et al., 2014)

El diagnóstico serológico presenta algunas limitantes, por ejemplo, no es útil en los casos sospechosos de Chagas congénito en recién nacidos durante el periodo neonatal, ni en individuos inmunocomprometidos en los cuales la producción de anticuerpos es escasa. Por otra parte, debido al mantenimiento de una respuesta de anticuerpos, estos resultan de poca utilidad en la definición del criterio de cura y de forma general presentan baja especificidad debido a la posibilidad de reacciones cruzadas con otros parásitos fundamentalmente *Leishmania* spp. y *T. rangeli* (Chiaramonte et al., 1999; Corredor Arjona, 1999).

Trypanosoma rangeli constituye el segundo parásito del género *Trypanosoma* que infecta humanos al igual que animales domésticos y salvajes en América Central y del Sur, se considera no patógeno para el hospedero vertebrado (incluyendo humano) (Vallejo et al., 2003). Este parásito comparte con *T. cruzi* la distribución geográfica, así como características biológicas e inmunológicas tales como: reservorios animales, vectores y determinantes antigénicos, de ahí que hoy constituye un serio problema en la epidemiología y el diagnóstico de EC, por tanto, es de gran importancia el desarrollo de metodologías que permitan el diagnóstico diferencial de las dos especies del parásito (Cuba Cuba, 1998; Gulh y Vallejo, 2003).

3.6.4. Diagnóstico molecular

Las limitaciones en la sensibilidad y especificidad de las pruebas parasitológicas y serológicas de laboratorio, especialmente cuando se trata del diagnóstico de la fase crónica, explican el interés y la necesidad de contar con un método directo más sensible que permita monitorear la presencia del parásito y confirmar la etiología de la enfermedad (Gil et al., 2007; Schijman et al., 2011). En este sentido, la principal técnica que ha sido utilizada en la investigación de *T. cruzi*, directamente en la sangre de pacientes crónicos, es el ensayo molecular por la PCR, basado en el empleo de oligonucleótidos sintéticos que amplifican secuencias de ADN específicas del patógeno-blanco (Vallejo, 1998; Gulh et al., 2002).

Diferentes secuencias blanco se han utilizado para el diagnóstico molecular de EC, entre ellas se encuentran los minicírculos del kinetoplasto (ADNk) (Sturm et al., 1989; Avila et al., 1991; 1993; Breniere et al., 1995), la región nuclear repetitiva de 195pb (Moser et al., 1989; Diaz et al., 1992; Kirchhoff et al., 1996), los miniexones (Murthy et al., 1992; Souto et al., 1996), el ARNr 24S (Souto et al., 1993); la proteína flagelar F29 (Souto et al., 1999), la región repetitiva de 1025pb (Requena et al., 1992) y la histona H2A (Gil et al., 2007). Sin embargo, la secuencia más ampliamente usada en los ensayos de PCR son los minicírculos de los kinetoplastos (Virreira et al., 2003).

Para el caso de la infección aguda la PCR es más sensible que el hemocultivo y el xenodiagnóstico y ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de la transmisión de madre a hijo, siendo más sensibles que las técnicas de concentración (Bua et al., 2013). Para el

diagnóstico de infección crónica por *T. cruzi*, la PCR tiene sensibilidad baja y variada que oscila entre el 2% y el 99% (76% promedio) (Candia-Puma et al., 2022). De forma general los procedimientos de PCR han mostrado valores variables de sensibilidad y especificidad dependiendo de un grupo de factores técnicos tales como: volumen de la muestra colectada, las condiciones y conservación de la muestra, el método utilizado para la extracción del ADN, la secuencia del parásito y los cebadores seleccionados, los reactivos usados así como las condiciones en el termociclador. La variabilidad de la sensibilidad de la PCR también se ha explicado en parte por la presencia intermitente y cantidad de parásito circulante en el momento en que se colecta la muestra de sangre, fase de infección, presencia de inmunosupresión, país de origen del paciente y diversidad genética de *T. cruzi* (Schijman et al., 2011). Sin embargo, la PCR puede ser útil cuando los resultados de serología no son concluyentes, para monitorear la detección temprana del fracaso del tratamiento, y en el manejo de pacientes inmunosuprimidos (Batista et al., 2010; Blum-Dominguez et al., 2011; Molina et al., 2014; Morillo et al., 2015; Pérez-Molina y Molina, 2018; Candia-Puma et al., 2022).

Otros métodos de PCR como la PCR en tiempo real (qPCR) se han ido introduciendo en el diagnóstico de la EC. En el meta-análisis presentado por Candia-Puma y colaboradores (2022), la qPCR muestra el mejor rendimiento entre los métodos de diagnóstico molecular, con un media de sensibilidad y especificidad de 94,0 y 98,0%, respectivamente. Se ha afirmado que la eficacia diagnóstica de las técnicas moleculares es alta en la EC aguda, mientras que en la fase crónica las técnicas inmunológicas son más efectivas (Ferrer et al., 2013); al comparar el ELISA a los métodos de qPCR en el diagnóstico de los resultados agudos de EC, no se demostró diferencia. La qPCR para *T. cruzi* ha sido validada analíticamente, pero aún no ha sido clínicamente validado para evaluar su utilidad clínica (Duffy et al., 2013), mientras que recientemente el uso combinado de técnicas serológicas y qPCR permitieron identificar la mayor prevalencia de EC en humanos, en comparación con el uso de una sola de estas herramientas de detección (Chan-Pérez et al., 2022).

3.6.5. Guía de la OPS para Diagnóstico de EC

La OPS elaboró lineamientos para el manejo de infecciones por *T. cruzi* con el objetivo de fortalecer la implementación de políticas y el manejo de sus condiciones clínicas (OPS, 2020)

Una síntesis de las recomendaciones establecidas en la Guía para el Diagnóstico y Tratamiento de la EC, publicado (solo en español) por la OPS en 2018 ha sido publicado para brindar estrategias para el diagnóstico oportuno y tratamiento de la EC, así como consideraciones para la implementación de dichas estrategias (OPS, 2020). Estas recomendaciones son aplicables a pacientes adultos y pediátricos con sospecha de EC, exposición a *T. cruzi* o un diagnóstico confirmado de EC aguda, crónica o congénita. Las recomendaciones se han clasificado en dos categorías: condicionales o fuerte, mientras que la calidad de la evidencia existente para cada recomendación ha sido clasificada como alta, moderada, bajo y muy bajo, según el enfoque GRADE (Guyatt et al., 2011).

Se han hecho diez recomendaciones y cinco de ellas se dedican al diagnóstico (OPS, 2020; Shijman et al., 2022), son ellas:

(i) ¿En pacientes con sospecha de *T. cruzi* crónico en infección, cual es la mejor estrategia diagnóstica (una o dos técnicas serológicas)?

En estos casos, se recomienda utilizar el “estándar de diagnóstico”, que es la combinación de dos pruebas serológicas utilizando diferentes antígenos capaces de detectar anti-*T. cruzi* anticuerpos (ELISA, IHA, IIF), y una tercera prueba si los resultados de dichas pruebas son discordantes. La calidad de la evidencia para esta recomendación se considera alta/moderada.

(ii) En el marco de las encuestas seroepidemiológicas para detectar pacientes con enfermedad de Chagas crónica, cual es la mejor estrategia diagnóstica?

Se recomienda emplear ELISA o pruebas de inmunocromatografía (RDT) para estudios epidemiológicos de la EC. Esta recomendación es fuerte, porque existe un alto grado de confianza y correlación entre ELISA o RDT, como ensayos únicos, fácilmente aplicables en estos estudios epidemiológicos.

(iii) ¿Cuál es el mejor método de diagnóstico en bancos de sangre?

Se recomienda utilizar kits ELISA de alta sensibilidad o inmunoensayos magnéticos quimioluminiscentes (CMIA). La calidad de la evidencia para esta fuerte recomendación se considera alta/moderada.

(iv) ¿En pacientes con sospecha de infección aguda por *T. cruzi* (congénita o adquirida recientemente), cuales métodos diagnósticos son los más útiles?

En estos casos, la OPS recomienda el uso de pruebas parasitológicas y eventual seguimiento serológico (en infección congénita después de los ocho meses de edad y en infecciones causadas por otras vías de transmisión, se debe buscar la seroconversión). La calidad de la evidencia para esta recomendación es moderada.

3.7. Tratamiento

A nivel mundial, la enfermedad está sub-diagnosticada en gran medida (se estima que el 90% de las personas afectadas no conocen de su infección y por lo tanto están en riesgo de transmitirla y sufrir complicaciones (Basile et al., 2011)) e infra-tratados (menos del 1 % de las personas afectadas tienen acceso a tratamiento (Ribeiro et al., 2009)).

Sólo dos fármacos, el benznidazol y el nifurtimox, están licenciados para el tratamiento de EC. Ambos han sido el pilar del tratamiento parasiticida por casi 50 años, aunque su perfil de seguridad y eficacia no es el ideal. Además, dado que la eficacia del tratamiento parece disminuir con el tiempo desde la infección primaria, la detección temprana e intervención son cruciales.

El tratamiento con fármacos anti-Tripanosómicos siempre se recomienda para EC aguda y congénita, las infecciones reactivadas y las enfermedades crónicas en niños menores de 18 años. Dado que la persistencia de la parasitosis y la inflamación crónica concomitante subyacen a la cardiomiopatía chagásica crónica, el tratamiento parasiticida se ofrece generalmente a los pacientes con EC crónica en la fase indeterminada y a los pacientes con enfermedad leve a moderada (Andrade et al., 2011). Sin embargo, las opiniones difieren sobre el impacto del tratamiento etiológico en esta fase crónica. Los resultados de una revisión sistemática y meta-análisis (Pérez-Molina et al., 2009) mostraron que el tratamiento con benznidazol tenía poco beneficio y que el efecto observado podría ser marginal comparado con placebo o sin tratamiento en la fase crónica. En el estudio BENEFIT, el tratamiento con benznidazol reduce significativamente el deterioro clínico cardíaco en pacientes con cardiomiopatía de moderada a severa (Morillo et al., 2015). Por otro lado, el tratamiento de las mujeres en edad fértil ha demostrado ser eficaz para

interrumpir la transmisión vertical (Fabbro et al., 2014). El tratamiento debe ser individualizado para pacientes mayores de 50 años y para pacientes con comorbilidades.

Nifurtimox fue el primer fármaco utilizado y se administra por vía oral en tres o cuatro dosis durante 60-90 días. Las tasas de cura en la fase crónica indeterminada oscilan de 86% en niños menores de 14 años a 7-8% en adultos (Streiger et al., 2004). La frecuencia de los efectos adversos por nifurtimox es 43,0-97,5%; los más comunes son anorexia, pérdida de peso, trastornos neurológicos (irritabilidad, insomnio, desorientación, cambios de humor, parestesias y neuropatía periférica), manifestaciones digestivas, tales como náuseas y vómitos, y, ocasionalmente, fiebre y erupción cutánea. El tratamiento se interrumpe en 14,5-75,0% de los casos (Jackson et al., 2010; Thakare et al., 2021).

Benznidazol es generalmente preferido sobre Nifurtimox debido a su mejor perfil de tolerabilidad, penetración de tejido, y posiblemente, la eficacia. Se administra oralmente en dos o tres dosis por lo general durante 60 días. Dosis más altas se recomiendan hasta 15 mg/kg en casos de meningoencefalitis. De acuerdo con algunos resultados, 30 días de tratamiento puede ser útil para los adultos infectados crónicamente (Viotti et al., 2006). El benznidazol tiene una actividad considerable durante las fases tempranas de la infección por *T. cruzi*: la curación serológica es alcanzado en hasta el 100% de los pacientes con enfermedad congénita tratados durante el primer año de vida y en 76% de los pacientes con enfermedad aguda (Cancado, 1999; Schijman et al., 2003). En la fase crónica, las tasas de curación son mucho más bajas: 60-93% en niños de hasta 13 años y 2-40% en adultos con enfermedad crónica tardía, aunque estos valores mejoran con un mejor seguimiento (Cancado, 1999; Fabbro et al., 2007). Los efectos adversos más comunes implican hipersensibilidad, principalmente en forma de erupción cutánea (29-50%), intolerancia digestiva (5-15%) y síntomas como anorexia, astenia, dolor de cabeza y trastornos del sueño (40%), la neuropatía y la depresión de la médula ósea se consideran raras. El tratamiento es Interrumpido en el 9-29% de los casos, aunque estas reacciones son reversibles y severas en menos del 1% de casos (Molina et al., 2015). Ni los niveles séricos elevados de fármacos ni dosis diarias (> 300 mg) se han asociado con un aumento de la frecuencia de eventos adversos (Pinazo et al., 2012).

Desde la introducción de benznidazol y nifurtimox, sólo el alopurinol y los triazoles (biosíntesis de ergosterol Inhibidores) se han estudiado en ensayos clínicos, estudios

observacionales y reportes de casos. La monoterapia con ravuconazol o posaconazol ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de la infección crónica por *T. cruzi* (Molina et al., 2014) y la combinación de posaconazol y benznidazol no proporciona más ventajas sobre la eficacia o la seguridad de monoterapia con benznidazol. La evidencia reciente sugiere que los actuales regímenes de benznidazol pueden ser optimizados con esquemas de dosis intermitentes, esquemas de reducción de dosis o terapias combinadas (Bustamante et al., 2013; Garcia-Huertas y Cardona-Castro, 2021).

Un obstáculo importante para el desarrollo de fármacos es la mala traducción de los datos "in vivo" a la enfermedad humana. Los modelos animales disponibles tienen un valor predictivo limitado para la evaluación preclínica de terapias novedosas, y en parte explican los fracasos clínicos observados con nuevos triazoles (Francisco et al., 2015). Los modelos animales tienen que predecir más confianza en la eficacia de los nuevos fármacos y los ensayos clínicos deben ser estandarizados (Chatelain et al., 2015)

Por lo tanto, es necesario identificar nuevas alternativas terapéuticas seguras y efectivas para tratar la enfermedad de Chagas, aunque los gobiernos y la industria farmacéutica han mostrado poco interés en contribuir a esta solución. Instituciones y grupos de investigación, por otro lado, han trabajado en algunas estrategias que pueden ayudar a abordar el problema. Algunos de estos incluyen la modificación de las dosis de medicamentos convencionales, la reutilización de medicamentos y la terapia combinada. También se han estudiado plantas y compuestos derivados con efectos antiparasitarios, aprovechando los conocimientos de la medicina tradicional. Otros han estudiado el parásito para identificar genes esenciales que pueden usarse como objetivos terapéuticos para diseñar nuevos medicamentos dirigidos. Algunos de estos estudios han generado resultados prometedores, pero pocos llegan a estudios de fase clínica. Se debe alentar a las instituciones y grupos de investigación a unificar esfuerzos y cubrir todos los aspectos del desarrollo de medicamentos de acuerdo con la disponibilidad de recursos y conocimientos. Al final, este intercambio de conocimientos llevaría al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para tratar la enfermedad de Chagas y beneficiar a las poblaciones a las que afecta (Garcia-Huertas y Cardona-Castro, 2021).

3.8. Diversidad genética de *T. cruzi*.

Se sabe que *T. cruzi* tiene una población heterogénea con una diversidad genética actualmente clasificada en UDT, denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y TcBat (Marcili et al. 2009; Zingales et al. 2009, 2012). Las relaciones evolutivas entre las UDT se entienden parcialmente y, según el número y la naturaleza de los genes analizados, las relaciones entre los mismos cambian, de ahí que se plantee que las relaciones evolutivas entre los UDT no han sido completamente dilucidadas. Todos los enfoques coinciden en que TcI y TcII permanecen como dos líneas puras que evolucionaron separadamente a partir de un ancestro común que data de aproximadamente 1-3 millones de años. Los linajes TcV y TcVI claramente tienen un origen híbrido con TcII y TcIII como progenitores imputados y los linajes TcIII y TcIV podrían también haberse originado a partir de un híbrido entre TcI y TcII, pero algunos autores no están de acuerdo con estos resultados de ahí que la evolución de estos linajes ha sido un tema de intenso debate. Las relaciones evolutivas entre las diferentes UDT y por consiguiente la historia evolutiva de *T. cruzi* continúa bajo investigación (Brenière et al., 2016).

TcI tiene una amplia distribución geográfica en todo el continente americano y diferentes mamíferos (por ejemplo: zarigüeyas, roedores, primates y osos hormigueros) y especies de triatomíneos, por ejemplo: *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *Triatoma pseudomaculata* (Correa y Espinola, 1964), *Rhodnius nasutus* (Stal, 1859) y *Rhodnius pictipes* (Stal, 1872), que están involucrados en el ciclo selvático (Zingales et al. 2012; Zingales 2018). También se ha aislado de perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) (Bezerra et al., 2014). Por el contrario, TcII es encontrado predominantemente en las regiones del sur y centro de América del Sur, siendo raramente reportado en América del Norte (Zingales, 2018). Esta UDT se ha detectado especialmente en murciélagos, primates, roedores, marsupiales, pizotes (Jansen et al. 2015, 2018); y vectores triatomíneos (Lilioso et al., 2017; Darío et al., 2018). Este se ha identificado con mayor frecuencia en ciclos domésticos que en ciclos selváticos.

TcIII se distribuye geográficamente desde el noreste de Venezuela a Argentina, estando predominantemente asociado con el ciclo selvático (Zingales, 2018). Esta UDT es comúnmente encontrada en ecotopos terrestres y fosoriales en armadillos de los géneros *Dasyus*, *Chaetophractus* y *Euphractus* actuando como reservorios principales (Zingales et al., 2012; Zingales, 2018), pero también se pueden encontrar en marsupiales (ejemplo:

Didelphis spp., Monodelphis spp.), roedores (ejemplo: *Galea spixii*) y humanos (Abolis et al. 2011; Zingales et al., 2012; Martins et al., 2015). Del mismo modo, TcIV es mayormente relacionado con el ciclo selvático, siendo reportado en Norte y sur América. Los principales reservorios para esta UDT en América del Sur son primates salvajes y pizotes (*Nasua nasua*), siendo los mapaches importantes reservorios en América del Norte (Zingales, 2018).

TcV y TcVI son raros en el ciclo salvaje y los datos sobre su rango de hospederos es escaso. De hecho, se han publicado algunos reportes en huéspedes mamíferos de los géneros *Dasypus*, *Euphractus* y *Octodon* (Zingales et al., 2012). En Brasil, TcVI ha sido aislado en *T. brasiliensis* (Lima-Oliveira et al., 2020).

Por último, TcBat ha sido aislado de *M. pyotis* spp., *Noctilio* spp. y humanos (Marcili et al. 2009a; Ramírez et al. 2014), y también fue detectado en *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Cominetti et al., 2014). A diferencia de otras UDT TcBat no se desarrolla en especies de triatómidos criados en laboratorio y los cimicidos han sido inferidos como vectores potenciales. Además de Brasil TcBat fue reportado en murciélagos desde Panamá y Colombia (Zingales, 2018).

Todas las UDT son capaces de promover la EC. Sin embargo, TcI, TcII, TcV y TcVI son las UDT más prevalentes en pacientes en América Latina. TcI tiene una amplia distribución y prevalece en los pacientes de México, América Central, la región andina y Amazonía. En el centro y sudeste de Brasil TcII tiene alta representación en infecciones de Chagas. TcV es la UDT más común en Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay y se encuentra en alrededor del 50% de los pacientes en Argentina, que también están infectados con TcVI. Infecciones humanas por TcIV son raras, sin embargo, esta UDT es la causa secundaria de EC en Venezuela y reportado en transmisión oral de brotes en la Amazonía brasileña. TcIII se asocia principalmente con el ambiente selvático. Para TcBat, no hay ninguna descripción en humanos, excepto un informe de ADN TcBat en momias y en un niño de Colombia (Guhl et al., 2014; Ramírez et al., 2014). Otros estudios que emplearon varias técnicas de genotipado confirmaron la prevalencia de TcII y TcV en individuos con una amplia gama de enfermedades cardíacas y/o patologías digestivas y TcI en pacientes con formas indeterminadas o cardíacas en el norte de Brasil, Colombia, Guatemala, México y Panamá (Breniere et al., 2016; Izeta-Alberdi et al., 2016; Zingales, 2018). Con esta y otra

Como consecuencia de las diferencias genotípicas y fenotípicas de las cepas de *T. cruzi* y la distribución geográfica diferencial de las UDT en humanos, si se verificaron variaciones regionales en la sensibilidad de las pruebas serológicas. La resistencia natural al benznidazol y al nifurtimox, verificada *in vivo* e *in vitro* para algunos aislamientos de parásitos, no está asociada con ninguna UDT en particular, y no explica la diferencia marcada en la eficacia antiparasitaria de ambos fármacos en las fases aguda y crónica de la EC (Zingales, 2018).

El amplio debate existente sobre el tema hace necesario continuar los estudios de detección de UDT en muestras clínicas, vectores y reservorios de países endémicos y no-endémicos de la enfermedad y correlacionar los mismos con las manifestaciones clínicas, la susceptibilidad a los métodos de diagnóstico utilizados y la sensibilidad a los antiparasitarios. Pero para ello es importante contar con métodos moleculares más simples y/o estrategias más sencilla y reproducible 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.

Diferentes métodos moleculares han permitido la detección y diferenciación de las UDT de *T. cruzi* directamente a partir de muestras clínicas, vectores y reservorios (Cura y Shijman, 2013); en los que se incluyen los métodos de PCR (Souto y Zingales, 1993; Clark y Pung, 1994; Souto et al., 1996; Burgos et al., 2007), la PCR anidada (Bontempi et al., 2016), la PCR- RFLP (Westenberger et al., 2005; Freitas et al., 2006; Rozas et al., 2007; Zingales et al., 2012) y más recientemente la técnica de PCR en tiempo real (Cura et al., 2015; Muñoz-San Martín et al., 2017; Zulantay et al., 2022) y la misma acoplado al análisis de alta resolución de fusión (HRM siglas del inglés High Resolution Melting) (Freitas et al., 2005; Higuera et al., 2013).

De la misma forma diferentes blancos genéticos han sido utilizado en los métodos moleculares antes mencionados como son: mini-exon (Burgos et al., 2007), regiones intergénicas para miniexon (SL-IR) (Burgos et al., 2007), subunidad grande ARN ribosomal 24S (Souto y Zingales, 1993; Souto et al., 1996), subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S (Clark y Pung, 1994), fragmento nuclear A10 (A10) (Burgos et al., 2007), el citocromo oxidasa subunidad II (COII) (de Freitas et al., 2006), Proteína de unión a GTP similar a Rho (RHO1), 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMCOAR), Glucosa-6-

fosfato isomerasa (GPI), peroxidasa mitocondrial (TcMPX) (Diosque et al., 2014) y los minicírculos del ADN del kinetoplasto (Bontempi et al., 2016).

De forma general se utilizan flujogramas o esquemas de tipificación de secuencias multilocus que combinan un método molecular con diferentes blancos genéticos o juegos de cebadores o tres o más métodos moleculares diferentes, con diferentes blancos genéticos; de los antes mencionados. Con estos se llega a determinar el linaje del parásito a partir de aislamientos o directamente a partir de muestras clínicas de pacientes, vectores y reservorios (D'Ávila et al., 2009; Lewis et al., 2009; Burgos et al., 2010; Diosque et al., 2014; Lima et al., 2014; Cura et al., 2015; Joselin et al., 2021; Silva et al., 2021; Murillo Solano et al., 2021; Torhorst et al., 2022; Sánchez et al., 2022; Zulantay et al., 2022). Sin embargo, hasta el momento ningún blanco genético único permite la resolución completa de las UDT. De ahí la necesidad de buscar alternativas de detección más sencillas.

Un marcador evolutivo prometedor, la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), se ha demostrado que es útil para el análisis filogenético de varios parásitos como *Cryptosporidium* spp. (Langkjaer et al., 2007; Sulaiman et al., 2000), *Babesia* spp. (Yamasaki et al., 2002, 2007), *Giardia* spp. (Arisue et al., 2002b), *Entamoeba* spp. (Arisue et al., 2002b), *Microsporidium* spp. (Arisue et al., 2002b), *Blastocystis hominis* (Arisue et al., 2002a), los géneros *Leishmania* (Fraga et al., 2010, 2013, 2021; Castillo-Castañeda et al., 2022) y *Trypanosoma* (Fraga et al., 2016, 2021; Castillo-Castañeda et al., 2022). Las proteínas HSP70 están altamente conservadas en procariotas y eucariotas tanto en secuencia como en función, y tienen gran importancia como chaperonas moleculares y en el plegamiento y transporte de proteínas (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). Son una subfamilia de la familia HSP70 (Folgueira y Requena, 2007), que desempeña un papel importante en las adaptaciones ambientales de los *Trypanosomas*. Los genes de la subfamilia *hsp70* están dispuestos como una matriz de repetición en tándem de forma de cabeza a cola, de los cuales en *T. cruzi* están presentes al menos siete copias (Requena et al., 1988). Este gen ha sido utilizado para la detección e identificación de especies de *Leishmania* en el Viejo y Nuevo Mundo usando la PCR, seguido por análisis del RFLP, que muestran alta sensibilidad y especificidad en muestras clínicas (García et al. 2007; Fraga et al. 2012; Montalvo et al. 2012, 2014, 2017; Veland et al. 2012). De la misma forma este gen se ha utilizado para la detección y diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli*, mediante una PCR dúplex, mostrando una alta sensibilidad y especificidad (Fraga et al., 2014). El análisis

filogenético dentro de los aislamientos de *T. cruzi*, basados en este gen, mostraron cuatro grupos genéticos, correspondientes a las UDT: TcI, TcIII, TcIV y los UDTs TcII, TcV y TcVI que no forman entidades separadas, este gen se encuentra bajo una selección purificadora que le permite su conservación y preservar la funcionalidad de la proteína, sin embargo, se observan sitios parsimoniosamente informativos que lo hace un marcador molecular apropiado para diseñar métodos moleculares para la detección e identificación de las UDT de *T. cruzi* (Fraga et al., 2016).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio de validación de pruebas diagnósticas en el período de tiempo comprendido entre 2020 y 2021, en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología del IPK.

4.2 Universo de trabajo

El universo de trabajo estuvo integrado por ADN procedente de cepas de *T. cruzi* y otros trypanosomatidos caracterizadas como referencia y ADN procedente de aislamientos, muestras clínicas de individuos, vectores y reservorios; todos los cuales se detallan a continuación.

4.2.1 Cepas de referencia de *Trypanosoma* spp.

Se utilizaron como cepas de referencia muestras de ADN de 25 cepas de *T. cruzi* correspondientes a los diferentes linajes del parásito procedentes de diferentes orígenes geográficos, 1 cepa de *T. cruzi marinkellei*, 1 cepa de *T. rangeli*, una cepa de referencia de cada una de las siguientes especies: *T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei gambiense*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. congolense* y *T. theileri* provenientes de la Unidad de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica (IMT-A) (Tabla 1). La clasificación de especies y los linajes de *T. cruzi* se realizó de acuerdo a los métodos de análisis múltiple de enzimas mediante electroforesis (MLEE, siglas del inglés *Multilocus enzyme electrophoresis*), la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, siglas del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*), así como

la PCR-miniexon determinados en los laboratorios de los países de origen (Bosseno et al., 1996; Brenière et al., 1997; 1998; Bernabé et al., 2000).

Tabla 1. Cepas de referencia de *Trypanosoma* spp. a utilizar en el estudio.

Especie	Nombre de la Ceba	País	Genotipo^a	Sensibilidad (s)- Especificidad (e)^b	Panel de evaluación^c
<i>Trypanosoma cruzi</i> (n=25)	SP104	Chile	I	s	
	OPS21	Venezuela	I		v
	P209	Bolivia	I		v
	Cutia	Brazil	I		v
	X10/4	Brazil	I		v
	MAS	Brazil	II		v
	Esm	Brazil	II	s	
	Tu18	Bolivia	II		v
	IVV	Chile	II		v
	CBB	Chile	II		v
	PERU	Peru	II		v
	M5631	Brazil	III		v
	M6241	Brazil	III	s	
	CM17	Colombia	III		v
	X109/2	Paraguay	III		v
	92122102R	USA	IV		v
CanIII	Brazil	IV	s		
Theis	USA	IV		v	

	SO3	Bolivia	V	s	
	MN	Chile	V		v
	Bug2148	Brazil	V		v
	SC43	Bolivia	V		v
	CL Brener	Brazil	VI		v
	Tula	Chile	VI		v
	P63	Paraguay	VI	s	
	Y	Brazil	nk		v
	BRAZIL	Brazil	nk		v
	PERU	Peru	II		v
<i>T. rangeli</i>	RPLA4	Venezuela	nk	e	
<i>T. cruzimarkellei</i>	M1009	Venezuela	nd	e	
<i>T. bruceibrucei</i>	AnTat17.1	Congo	Tipo 1	e	
<i>T. bruceigambiense</i>	AnTat9.1	Camerum	nd	e	
<i>T. bruceirhodesiense</i>	AnTat 25.1	Ruanda	nd	e	
<i>T. congolense</i>	SER/71/STIB212	Tanzania	Savannah	e	
<i>T. equiperdum</i>	940M	-	nd	e	
<i>T. theileri</i>	T. thei	-	nd	e	
<i>T. evansi</i>	Rotat 1.2	Indonesia	nd	e	
<i>T. vivax</i>	Y486	Nigeria	Oeste de África	e	

^and: no determinado su genotipo.

^bAislamientos a utilizar en el estudio de sensibilidad se indican con "s" y en el estudio de especificidad con "e".

^cAislamientos evaluados se indican con v

4.2.2 Muestras de ADN de otros agentes infecciosos

Se utilizaron muestras de ADN de distintos agentes infecciosos provenientes del Banco de ADN del Laboratorio de Parasitología Molecular del IMT-A: *Plasmodiumfalciparum*, *Leishmanibraziliensis*(MHOM/BR/06/ICA), *L. peruviana* (MHOM/PE/90/LCA08_cl.2), *L. naiffi*(MDAS /BR/78/M5210), *L. guyanensis*(MHOM/PE/02/LH2372), *L.*

amazonensis(IFLA/BR/67/PH8), *L. donovani*(MHOM/SD/--/1-S),*L. infantum*(MHOM/FR/78/LEM75), *L. chagasi*(MHOM/BR/07/WC), *L. major*(MHOM/IL/67/LRC-L137), *L. tropica*(MHOM/PS/01/ISL590) y *L. aethiopica*(--/KE/--/161B).

4.2.3. Aislamientos del parásito

Se utilizaron como parte de la evaluación de la técnica, ADN extraído a partir de 11 aislamientos procedentes de México, 5 aislamientos procedentes de Colombia y 5 aislamientos procedentes de Bolivia. Estos aislamientos fueron donados por el Laboratorio de Medicina Transfusional de la Universidad Autónoma de Morelos, México; por el Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas Universidad de Antioquia, Colombia y el Instituto de Investigaciones Biomédicas e Investigación Social de la Facultad de Medicina, Cochabamba, Bolivia.

4.2.4. Muestras clínicas, vectores y reservorios

Se utilizaron como parte de la evaluación de la técnica, ADN extraído a partir de 30 muestras clínicas procedentes de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica confirmada a partir de la positividad a dos métodos serológicos de principio diferente determinados en cada laboratorio y el método de la PCRkDNA (121-122) (Sturm et al., 1989) y la PCR dúplex *hsp70* TcTr (Fraga et al., 2014): 10 pacientes de Bolivia y 1 paciente de Belice, que forman parte del Banco de ADN del Laboratorio de Parasitología Molecular del IPK; 9 pacientes de Colombia, cuyos ADN fueron donados por el Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas Universidad de Antioquia, Colombia, y 10 pacientes de México, cuyos ADN fueron donados por el Laboratorio de Medicina Transfusional de la Universidad Autónoma de Morelos, México. Además, se analizaron 20 muestras de ADN procedentes de vectores infectados con *T. cruzi* (Colombia (10), México (10)) y 5 muestras de ADN de reservorios infectados con *T. cruzi* (Colombia), donados por los laboratorios antes mencionados, muestras que resultaron positivas por los métodos moleculares PCRkDNA (121-122) (Sturm et al., 1989) y PCR dúplex *hsp70* TcTr (Fraga et al., 2014).

4.3 Normalización de la PCR *hsp70* UDT

Se normalizaron los componentes de la reacción de amplificación utilizando los cebadores sintéticos específicos *hsp70* UDT-F y *hsp70* UDT-R (Tabla 2), que amplifican una región de

545pb del gen que codifica la HSP70 de *T. cruzi* y que fueron diseñados previamente basados en el análisis de secuencias de especies de *Trypanosoma* (Fraga et al., 2016).

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificar la región específica del gen *hsp70* citoplasmático de *T. cruzi*.

Cebador	Secuencia (5'- 3')
<i>hsp70</i> UDT-F	GCCAGATCTTCTCGACGTACGCG
<i>hsp70</i> UDT-R	GATGGGCGTGACAGGTTCTCC

Para ello se realizaron distintos experimentos. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ L, conformado por 2,5 μ L solución amortiguadora coloreado de la PCR 1 x (CoralLoad PCR buffer, en inglés), 1,5 mM de $MgCl_2$ (Qiagen, Hilden, Alemania), 5 μ L de solución amortiguadora Q 1 x (Qiagen, Hilden, Alemania), 200 μ M de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) (Eurogentec, Bélgica) y 10fg de ADN molde a amplificar (Cepa: MHOM/VE/77/OPS21). El resto de los componentes de la mezcla de reacción se evaluaron a diferentes concentraciones: cebadores (0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 μ M) (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba), enzima HotStarTaqPlus ADN polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania) (1; 1,5; 2,0; 2,5U); $MgCl_2$ (1,5; 2; 2,5; 3,0; 3,5mM) (Qiagen, Hilden, Alemania), cada uno de manera individual y manteniendo el resto de los parámetros constantes. Se incluyó un control negativo en cada experimento, que contenga H_2O destilada estéril en lugar de ADN molde de *T. cruzi*.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research, EUA) con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 $^{\circ}C$ por 5 min seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94 $^{\circ}C$ por 40 seg, hibridación; donde se evaluó un gradiente de temperaturas (50,0; 52,8; 54,8; 59,3; 64,8; 69,9; 73,1; 75 $^{\circ}C$) por 1 min y extensión a 72 $^{\circ}C$ por 1 min, con una extensión final después del último ciclo a 72 $^{\circ}C$ por 10 min.

Para la detección del producto de amplificación se analizaron 15 μ L de cada mezcla resultante en electroforesis en gel de agarosa 2%, preparado en tampón tris-borato-EDTA: tris-borato (0,045 mol/L), EDTA (0,001 mol/L) (TBE 0,5x) con bromuro de etidio 0,5 μ g/mL.

La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante luz ultravioleta y se utilizó un sistema compacto de imágenes de geles U:Genius (Syngene, Reino Unido).

4.4 Análisis de parámetros analíticos de la PCR $hsp70$ UTD

4.4.1 Sensibilidad analítica de la PCR $hsp70$ UTD

Este experimento permitió conocer el nivel de detección de parásito en la PCR. Se realizaron diluciones seriadas (1/10) en agua destilada estéril desde 1 ng hasta 10 fg, utilizando ADN de cepas representativas de cada uno de los linajes de *T. cruzi* de I al VI (Tabla 1). Posteriormente, se realizó la PCR siguiendo las condiciones previamente normalizadas, en el mismo volumen final, y los productos de amplificación de todas las diluciones realizadas se observaron en una corrida electroforética en las condiciones descritas en el acápite 3.3. La sensibilidad analítica estuvo dada por la cantidad mínima de ADN detectada.

4.4.2 Especificidad analítica de la PCR $hsp70$ UDT

Para estudiar la especificidad analítica de la PCR, se utilizó como molde 10 ng de ADN de distintos *Trypanosomas*: *T. bruceibrucei*, *T. bruceigambiense*, *T. bruceirhodesiense*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum* y *T. cruzimarinkellei*, así como otros microorganismos previamente mencionados en el acápite 3.2.2 (Tabla 1). Se realizó la reacción de amplificación de la PCR $hsp70$ UDT en las condiciones previamente normalizadas. Se preparó un tubo control positivo con 1ng de ADN de *T. cruzi* de la cepa MHOM/VE/77/OPS21 y un control negativo con agua bi-distilada estéril en vez de ADN molde. El resultado se observó mediante una corrida electroforética en gel de agarosa (acápites 3.3).

4.5 Evaluación de la utilidad de la PCR-RFLP $hsp70$ UDT

Se realizó la PCR $hsp70$ UDT en las condiciones previamente normalizadas utilizando como molde el ADN obtenido de un grupo de cepas de referencia y aislamientos de *T. cruzi* con una variada representación geográfica a lo que denominamos panel de evaluación (Tabla 1). A partir de los amplicones de la PCR $hsp70$ UDT obtenidos se realizó el análisis de RFLP. Las digestiones se realizaron en un total de 10 μ L que contuvo 5 μ L de producto de PCR en tampón óptimo 1x proporcionado por el fabricante, 1U *Agel* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania), 5U *Hinfl* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania) o 1 μ L

*HaeII*Fastdigest (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Para las digestiones dobles con las enzimas *Agel* y *Hinfl*, se usaron 1U y 5U, respectivamente en el tampón O, ya que la actividad de *Hinfl* en este tampón es solo del 50%. Las reacciones se incubaron 3 horas a 37 ° C, a excepción de *HaeII* (10 minutos). Posteriormente, los patrones de restricción se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa de pequeños fragmentos al 3% (Gentaur, Bruselas, Bélgica), que funciona a 3,5 V / cm durante 3 h. Se utilizó el marcador de peso molecular ADN GeneRuler™ de 100 pb (MBI Fermentas).

De igual forma se realizó el mismo procedimiento normalizado utilizando como molde ADN de aislamientos de parásitos descritos en el acápite 3.2.3. y seguidamente con el grupo de muestras clínicas de sangre periférica de individuos, vectores y reservorios descritos en el acápite 3.2.4., en todos los casos se utilizaron 5 µL del ADN como molde en la reacción de PCR normalizada y se comprobó el valor de detección y tipificación que tuvo este método. Se reportó el porcentaje de tipificación (muestras tipificadas/muestras totales x100) para cada uno de los grupos de muestras evaluadas: muestras clínicas de pacientes, vectores y reservorios; así como se expresó el porcentaje global de la técnica evaluada.

4.6. Consideraciones éticas

Esta investigación constituye una de las tareas del Proyecto "Desarrollo de capacidades para el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis americana y africana en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". El proyecto fue evaluado y aprobado para su ejecución por el Comité de Ética Institucional del IPK (Proyecto de Investigación CEI-IPK-23-20).

Las muestras clínicas de pacientes utilizados en el estudio fueron obtenidas del citado proyecto, de las que se utilizó el ADN extraído que se encuentra conservado en el banco de ADN del Laboratorio de Parasitología Molecular del IPK y que fueron obtenidos previo consentimiento informado de los pacientes para la realización de estudios serológicos y moleculares, el resto de los ADN de las muestras clínicas utilizadas en el estudio fueron donadas por el laboratorio de Medicina Transfusional de la Universidad Autónoma de Morelos, México y el Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas Universidad de Antioquia, Colombia.

En el citado proyecto están descritas las consideraciones éticas que se tuvieron en cuenta: Los individuos participantes en la investigación solo sintieron una leve incomodidad durante la toma de la muestra de sangre periférica, sin embargo, en términos de beneficios, los individuos obtuvieron un diagnóstico sobre EC, seguido de asistencia médica y tratamiento adecuado, para aquellos que resultaron enfermos.

En la investigación participaron todos los estudiantes de medicina procedentes de países endémicos de la enfermedad que comenzaron sus estudios en la ELAM y colaboradores cubanos en áreas endémicas que regresaron a Cuba, que ofrecieron su consentimiento informado para participar, ambos durante los años 2014 y 2016. Los criterios de exclusión fueron aquellos que no desearan participar en la investigación.

Todo el personal involucrado en la investigación contó con la preparación y conocimientos necesarios para llevar a cabo todas sus funciones.

Para ninguno de los individuos involucrados en el estudio se procedió a retirar o aplazar terapias estándares por el propósito de la investigación. No estar de acuerdo en participar en esta investigación, no privó a los participantes de contar con el resultado a través del algoritmo diagnóstico que hoy se tiene establecido por el Programa de Control Sanitario Internacional del MINSAP.

Los pacientes confirmados de tener EC mediante los métodos serológicos y moleculares fueron tratados siguiendo los criterios establecidos por la OMS y las políticas del MINSAP, Cuba. Se utilizó benznidazol 8mg/kg/día, 3 veces al día, durante 60 días, indicado por médicos especialistas del IPK con supervisión del personal médico de atención de la ELAM.

Así mismo, se aseguró la confidencialidad y seguridad de la información y los resultados. Sólo tuvieron acceso a los datos personales de los participantes de la investigación, el personal previamente autorizado por el DrC. Jorge Fraga, jefe del proyecto y tutor de la tesis tomándose todas las medidas para asegurar la confidencialidad y seguridad de la información personal de cada paciente:

- Cada individuo tuvo un código y de esta manera fue manipulado en toda la investigación.

- El personal encargado del procesamiento de los datos no reveló en caso alguno directa, ni indirectamente los hechos, datos o informaciones que se obtuvieron.
- Los sistemas de informatización tuvieron incorporadas las medidas de seguridad necesarias que evitaron la pérdida de los datos, la alteración de los mismos y que otras personas, no autorizadas, accedieran a los datos de los individuos.

Para tomar el consentimiento informado de cada individuo participante, en la ELAM e IPK según el grupo de individuos se le ofreció participar en el estudio por parte del médico de asistencia en ambas instituciones a partir del documento de consentimiento informado preparado. Una vez firmado el mismo se procedió a la toma de la muestra para los efectos de la investigación.

5. RESULTADOS

5.1. Normalización de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* para la detección de las UDT de *T. cruzi* en muestras clínicas, vectores y reservorios.

Se normalizaron los componentes de la PCR utilizando los cebadores sintéticos específicos *hsp70* UDT-F y *hsp70* UDT-R, que amplifican una región de 545pb del gen que codifica la HSP70 de *T. cruzi* y que fueron diseñados previamente basados en el análisis de secuencias de especies de *Trypanosoma*.

Fueron determinadas las condiciones óptimas de los componentes de la reacción de la PCR, probándose diferentes concentraciones de MgCl₂, cebadores y Taq ADN polimerasa. En todos estos casos se mantuvo constante en la mezcla de reacción la cantidad de dNTPs, tampón de amplificación y las condiciones en el termociclador. De igual forma, se probaron diferentes temperaturas de hibridación manteniendo constantes los componentes de la mezcla de reacción.

En la Figura 9A se aprecia que la banda amplificada aumenta su intensidad desde 1,5mM hasta 2,5mM de MgCl₂ y que al incrementar la concentración hasta 3,5mM la intensidad de la banda disminuyó. De ahí que consideramos 2,5mM como la concentración óptima de MgCl₂.

En la Figura 9B se aprecian los patrones de amplificación al variar las concentraciones de cebador desde 0,4μM hasta 2,0μM. Al utilizar 0,4μM la banda esperada aparece de forma muy tenue. A partir de 1,2μM aumenta la intensidad de la banda con respecto a las dos primeras concentraciones, y se mantiene aumentando en la medida que lo hace la concentración del cebador. Asumimos como concentración óptima 1,6μM, al observarse mayor intensidad con la menor cantidad de cebador a utilizar. Al aumentar la concentración a 2μM la intensidad de la banda disminuye.

En la Figura 9C se observa cómo a partir de 1,0U y hasta 2,5U de la enzima Taq ADN polimerasa ocurre un ligero aumento en la intensidad de la banda amplificada. Se consideró como concentración óptima 1,0U en 25 μL de reacción donde se obtiene una banda con intensidad adecuada para la reacción de la PCR a la menor cantidad de enzima.

Una vez optimizados los componentes de la mezcla de reacción de la PCR, se probaron diferentes temperaturas de hibridación (Figura 9D). Se consideró como temperatura óptima 65,0°C, con la cual aparece una banda de amplificación con mayor intensidad.

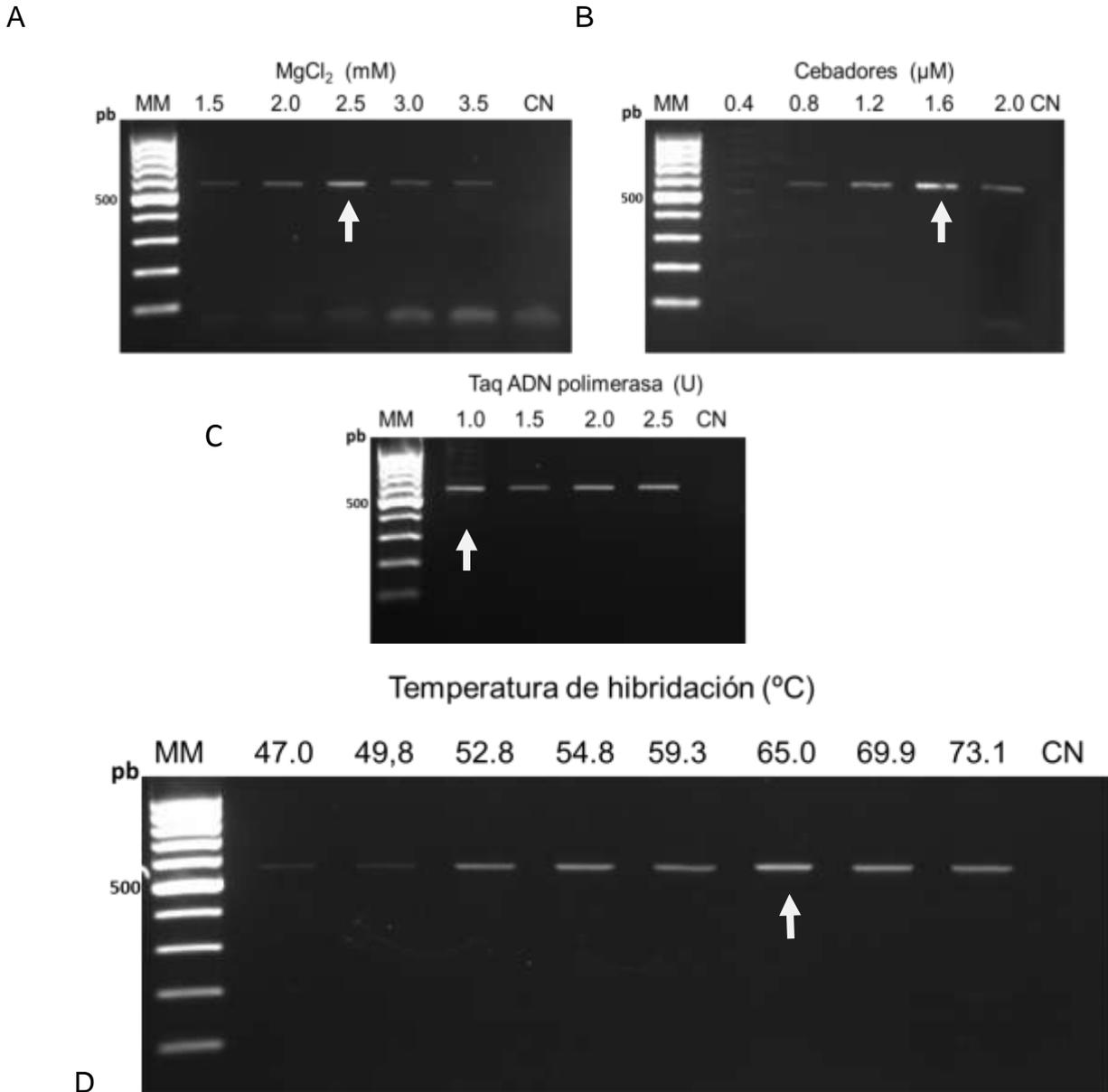


Figura 9. Patrón de amplificación obtenido al variar la concentración de los componentes de la PCR *hsp70* y la temperatura de hibridación en las condiciones en el termociclador. A) $MgCl_2$, B) Cebadores, C) Taq ADN polimerasa, D) Gradiente de temperatura de hibridación. Las concentraciones de los componentes de la reacción y la temperatura evaluadas aparecen especificadas en cada carril. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). La flecha indica la temperatura óptima del proceso.

En las Tablas 3 y 4 se resumen las condiciones óptimas de los componentes de la mezcla de reacción de la PCR UDT *hsp70* y en el termociclador.

Tabla 3. Condiciones óptimas de los componentes de la mezcla de la PCR UDT *hsp70*, y el juego de cebadores *hsp70* UDT-F y *hsp70* UDT-R, con el empleo de la cepa OPS21 de *T. cruzi*

Componentes	Concentración Final
volumen final	50 µl
Solución-Q	1X
Tampón estándar-PCR	1X
MgCl ₂ .	2,5 mM
<i>hsp70</i> UDT-F	1,6 µM
<i>hsp70</i> UDT-R	
dNTPs	200µM
HotStarTaq Plus DNA Polimerasa	1 U

Tabla 4. Condiciones óptimas de las condiciones de la reacción de la PCR UDT *hsp70*, y el juego de cebadores *hsp70* UDT-F y *hsp70* UDT-R, con el empleo de la cepa OPS21 de *T. cruzi*

Fases de termociclado	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	5 min	95°C	1
Desnaturalización	40 seg	94°C	35
Hibridación	1 min	65°C	
Extension	1 min	72°C	
Extension final	10 min	72°C	1
	∞	15°C	1

5.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas de la técnica

La sensibilidad analítica de la PCR *hsp70* UTD se evaluó en un panel constituido por seis aislamientos de *T. cruzi* correspondientes a los seis linajes (UDTTcI-UDTTcVI) de este

parásito, en todos los casos se utilizaron diluciones del ADN extraído de las cepas de referencia. Para todas las UDT de *T. cruzi*, el tamaño del amplicón de PCR-*hsp70* UTD coincidió con el análisis in silico (545 pb). La PCR pudo detectar 10 fg (0,05 genomas del parásito) de ADN para cada UDT de *T. cruzi*. Para los seis linajes del parásito, fue posible detectar hasta la última concentración en la que se observó la banda esperada, de 545pb (Figura 10). Esto representa aproximadamente el equivalente al ADN de menos de un parásito.

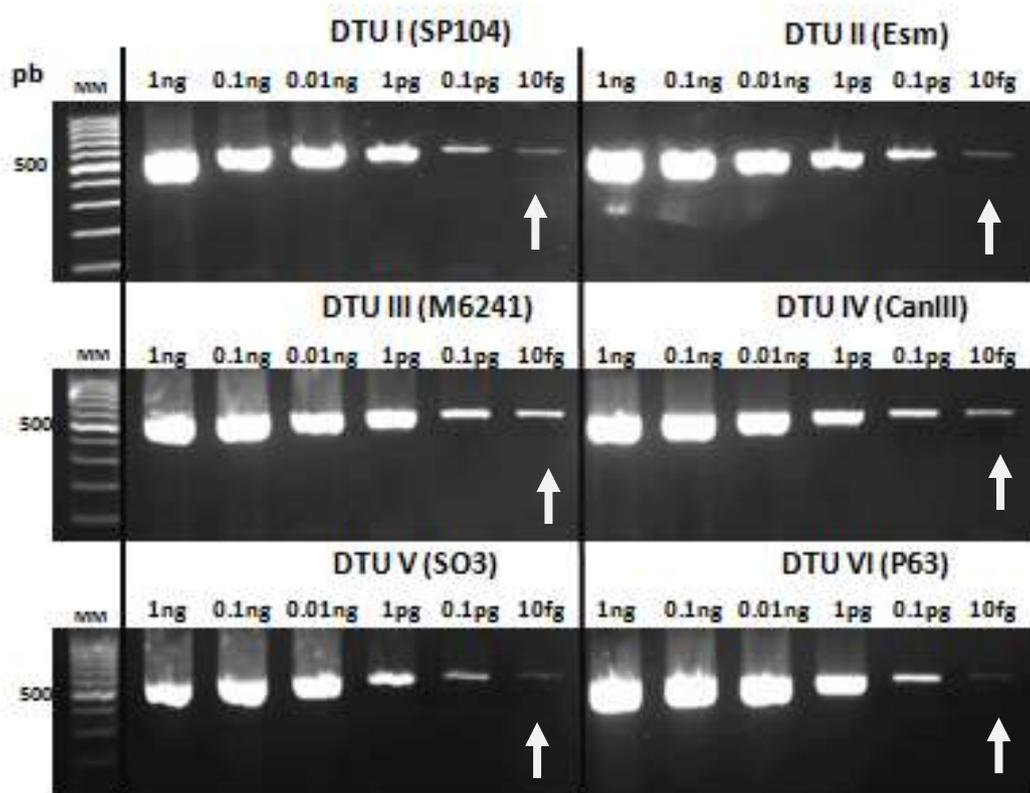


Figura 10. Sensibilidad analítica de PCR UDT *hsp70*. Electroforesis en gel de agarosa a 2 % que muestra los resultados de la amplificación del ADN. Se especifica la cepa de *T. cruzi* utilizada y el linaje al que corresponde en la parte superior de cada gel presentado. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Las cantidades de ADN de *T. cruzi* se indican en cada carril. La flecha indica las condiciones óptimas en cada uno.

En la evaluación de la especificidad analítica se utilizó un panel de muestras de ADN de distintos parásitos. Para el caso de protozoos evaluados *T. brucei*, *T.*

bruceigambiense, *T. bruceirhodesiense*, *T.vivax*, *T. evansi* y *T. equiperdum*, para ninguna de las especies de *Leishmania* estudiada ni *P. falciparum*, se obtuvo el patrón de amplificación correspondiente a la banda específica de 545 pb *hsp70* de *T. cruzi*(Figura 11). La banda de amplificación correspondiente a 545pb que aparece además de *T. cruzi* en *T. cruzimarinkellei*, *T. rangeli* y *T. lewisi*, las digestiones posteriores del producto de PCR con las enzimas de restricción que se proponen para diferenciar los linajes de *T. cruzi*, permitirán la identificación de estas especies y subespecies de *Trypanosoma*.

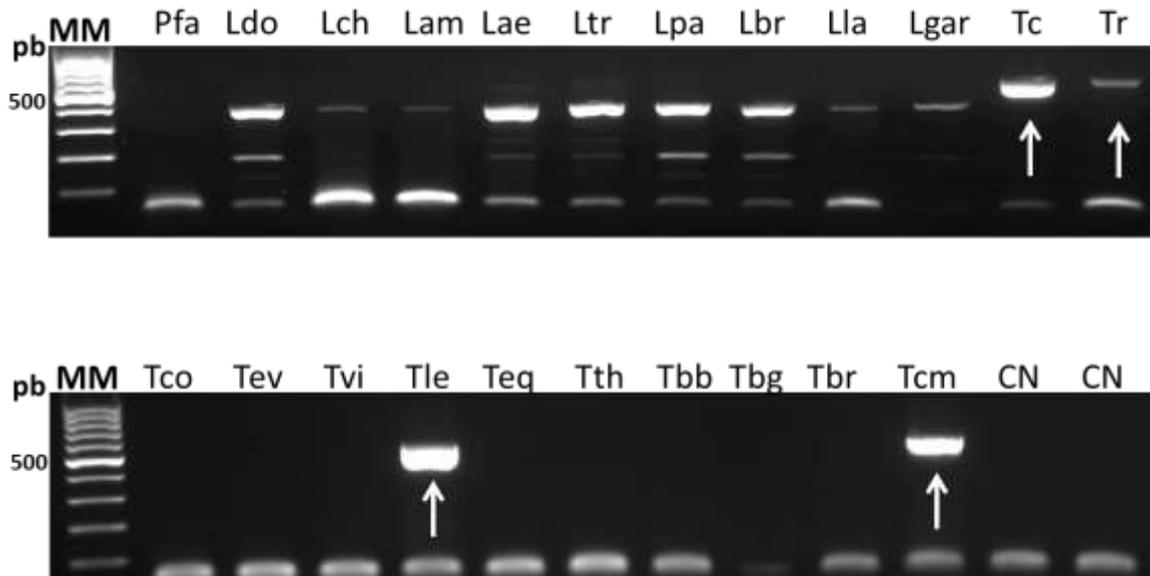


Figura 11. Resultado de la especificidad analítica de la PCR *hsp70*. Electroforesis en gel de agarosa a 2 % que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante PCR *hsp70* utilizando diferentes especies de parásitos. A: *Plasmodium falciparum*, *Leishmaniadonovani*, *Leishmaniachagasi*, *Leishmaniaamazonensis*, *Leishmaniaaethiopica*, *Leishmaniatropica*, *Leishmaniapanamensis*, *Leishmanibraziliensis*, *Leishmanialainsoni*, *Leishmaniagarnhami*, *Trypanosomacruzi* y *T. rangeli* ; B: especies y subespecies de *Trypanosoma*: *Tcongolenses*, *T. evansi*, *T vivax*, *T lewisi*, *T equiperdum*, *T theileri*, *T. bruceibrucei*, *T. bruceigambiense*, *T. bruceirhodesiense*, *T cruzimarinkellei*. En cada carril se presenta las especies y subespecies de parásitos estudiados. La flecha indica donde hubo amplificación de la talla esperada de 545pb. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

5.3. Evaluación de la PCR-RFLP *hsp70* UDT en la diferenciación de *T. cruzi* en un panel de cepas bien caracterizado.

Los patrones representativos de las restricciones enzimáticas obtenidos del análisis de cada uno de los ADNs correspondientes a las cepas de referencia y aislamientos

estudiadas se muestran en la figura 12. Se corroboraron los patrones esperados *in silico* para la diferenciación de los diferentes linajes. La digestión doble con las enzimas *Agel* y *Hinfl* produjeron fragmentos de restricción de 303/242 pb para TcI, 335/210 pb para TcII, V y VI y 545 pb para TcIII y IV, como se confirma en la Figura 12. No se observó diversidad intra-linaje al analizar los diferentes aislamientos dentro de una UDT. De ahí que podamos concluir que al realizar la PCR-RFLP *hsp70* UDT con las enzimas de restricción combinada *Agel/Hinfl*, tomando como base el producto amplificado de cada cepa, esta digestión permitió diferenciar 3 patrones bien definidos correspondientes a las UDTs: TcI; TcIII -TcIV y TcII- TcV-TcVI.

La endonucleasa de restricción *HaeIII* por su parte produjo fragmentos de 330/129/86pb para TcII y IV, 416/330/129/86 pb para TcV y VI y 416/129 pb para TcIII. Igualmente, no se observó diversidad dentro del linaje al analizar diferentes aislamientos de *T. cruzi*. De ahí que con esta enzima de restricción se obtuvieron patrones de bandas capaces de diferenciar TcII de TcV-TcVI, TcIII y TcIV.

El algoritmo PCR-RFLP que propusimos y evaluamos, permite en dos pasos diferenciar las UDT TcI, TcII, TcIII y TcIV basado en el gen *hsp70*, sin embargo, no fue posible discriminar las UDT TcV y TcVI. De esta forma se comprueba los resultados *in silico* que permiten diferenciar las UDT TcI, TcII, TcIII, TcIV y TcV-TcVI, estos últimos no pudiéndose diferenciar utilizando la PCR-RFLP *hsp70* UDT.

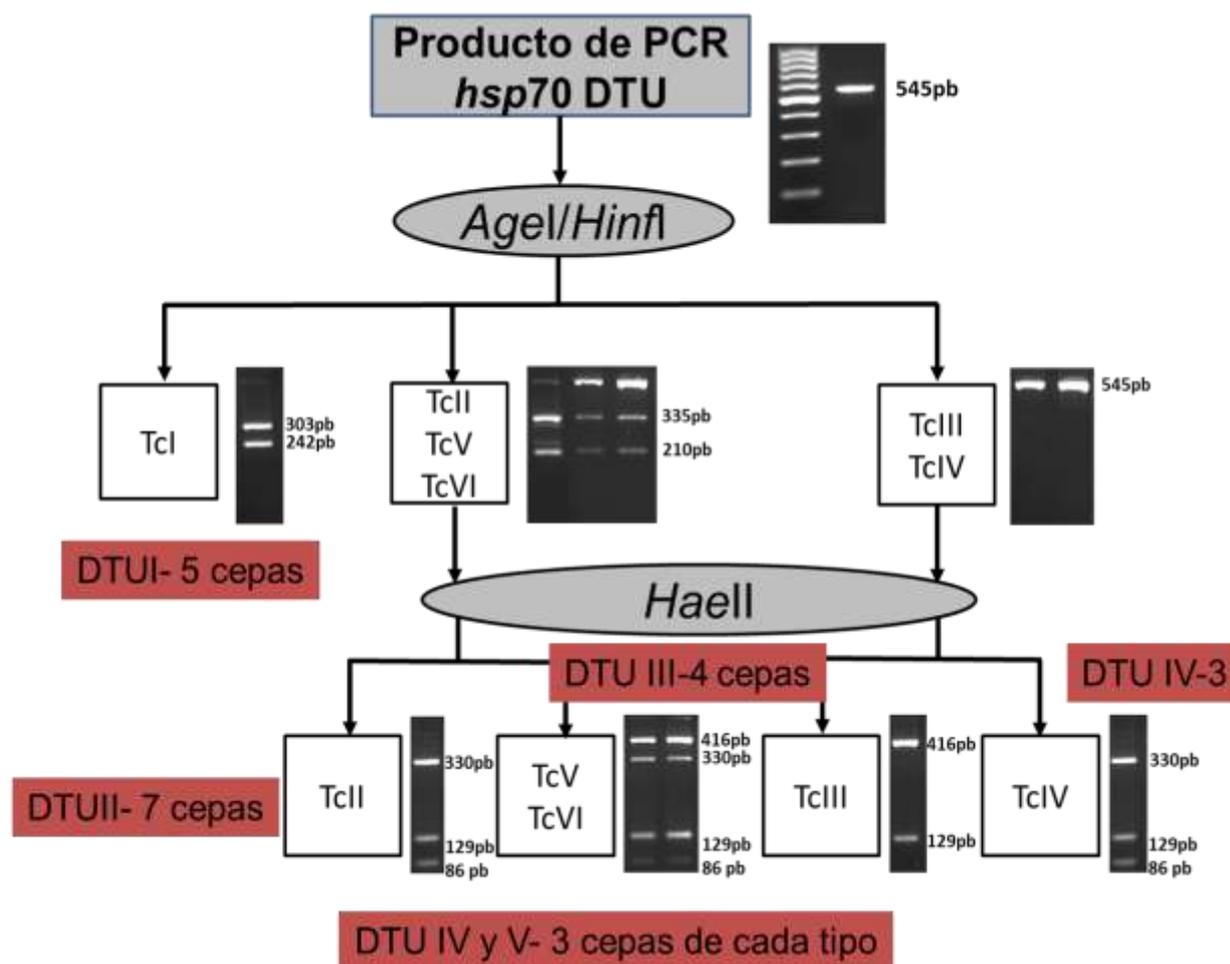


Figura 12. Patrones de digestión obtenidos al digerir los productos de PCR *hsp70* UDT con las enzimas de restricción *Agel/Hinfl* y *Haell*. En los recuadros las cepas de referencia evaluadas. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

5.4. Detección de las UDT de aislamientos de *T. cruzi* procedentes de México, Colombia y Bolivia.

Se amplificaron mediante la PCR *hsp70* UDT, 21 aislamientos procedentes de humanos, vectores y reservorios de México, Colombia y Bolivia. Se obtuvo la banda de amplificación correspondiente a 545pb en el 100% de los aislamientos estudiados (Figura 13A). De los once aislamientos procedentes de humanos y vectores de México, 8 mostraron un patrón correspondiente a las UDT Tc-I y tres a las UDT Tc-V o-VI. Al analizar los aislamientos de humanos, vectores y reservorios procedentes de Colombia y Bolivia (cinco aislamientos de cada uno) se identificaron en el caso de los aislamientos colombianos cuatro correspondientes a TcI y uno correspondiente a TcIV, y por su parte los aislamientos

procedentes de Bolivia uno correspondió con el UDT Tcly cuatro con los UDTsTcV o VI (Figura 13 B y C)

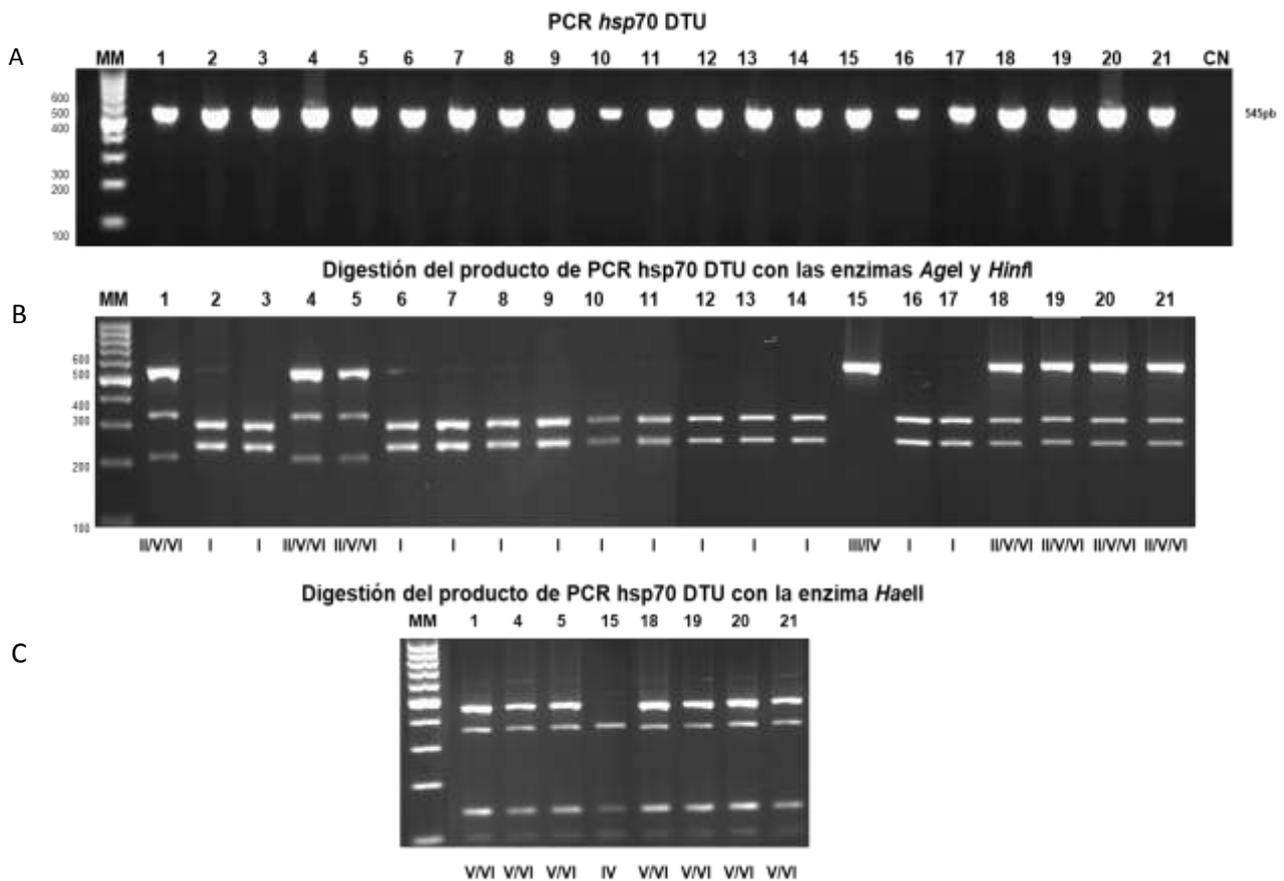


Figura 13. Patrón electroforético de la PCR-RFLP *hsp70* UDT obtenido de ADN procedente de aislamientos de *T. cruzi* de México, Colombia y Bolivia. A) PCR *hsp70* UDT. B) RFLP del producto de PCR de 545pb con las enzimas de restricción *Agel* y *HinfI*. C) RFLP del producto de PCR de 545pb con la enzima de restricción *HaeIII*. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Carril 1 al 11 Aislamientos procedentes de México; Carril 12 al 16: Aislamientos procedentes de Colombia; Carril 17 al 21: Aislamientos procedentes de Bolivia. CN: Control negativo. Debajo de cada gel en número romano el linaje correspondiente según la digestión.

5.4. Detección de las UDT en muestras biológicas de pacientes con *T. cruzi*, vectores y reservorios.

Un total de 55 especímenes biológicos, incluyendo muestras clínicas (n = 30), así como muestras de diferentes especies de vectores (n = 20) y reservorios de mamíferos (n = 5) de

procedentes de Bolivia, Colombia, México y Belice se evaluaron mediante PCR-RFLP *hsp70* UTD.

Muestras clínicas: De las 30 muestras clínicas analizadas procedentes de Colombia, Bolivia, Belice y México, de pacientes con Enfermedad de Chagas Crónico indeterminado confirmado a partir de la positividad a dos métodos serológicos de principio diferente determinados en cada laboratorio y el método de la PCRkDNA (121-122) (Sturm et al., 1989) y la PCR dúplex *hsp70* TcTr (Fraga et al., 2014), se amplificaron mediante la PCR *hsp70* UDT, 14 muestras clínicas (Figura 14 A), correspondiente a 4 muestras procedentes de Colombia, 4 procedentes de Bolivia, la muestra de Belice y 5 muestras procedentes de México. Estas muestras se les aplicó la técnica de RFLP *hsp70* UDT resultado 3 de las muestras clínicas procedentes de Colombia alTcl y uno a TcII, las procedentes de Bolivia 3 TcVoVI y uno TcI, la muestra de Belice correspondió a TcI y las procedentes de México, 3 resultaron TcI, uno a TcIII y otro a TcIV (Figura 14 B y C). De forma general el ensayo de PCR-RFLP *hsp70* UDT permitió tipificar el 46,6% de las muestras clínicas analizadas.

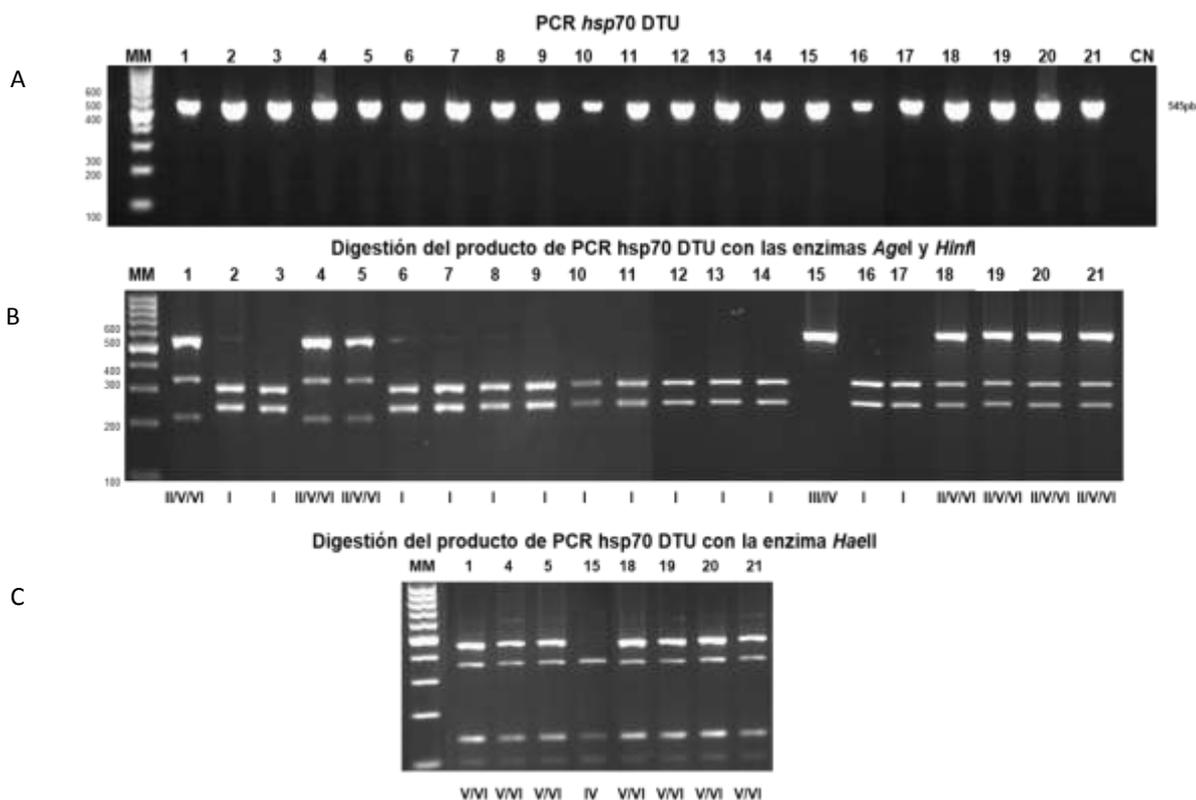


Figura 14. Patrón electroforético de la PCR-RFLP *hsp70* UDT obtenido de ADN procedente de muestras clínicas de pacientes con Enfermedad de Chagas crónico de Colombia, Bolivia, Belice y México. A) PCR *hsp70* UDT. B) RFLP del producto de PCR de 545pb con las enzimas de restricción *Agel* y *HinfI*. C) RFLP del producto de PCR de 545pb con la

enzima de restricción *HaeIII*. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Carril 1 al 9: Muestras clínicas procedentes de Colombia; Carril 10 al 19: Muestras clínicas procedentes de Bolivia; Carril 20: Muestra clínica procedente de Belice; Carril 21 al 30: Muestras clínicas procedentes de México. CN: Control negativo. Debajo de cada gel en número romano el linaje correspondiente según la digestión.

Vectores: Al analizar 20 muestras de vectores procedentes de México y Colombia, a partir de la positividad al método de la PCR de DNA (121-122) (Sturm et al., 1989) y la PCR dúplex *hsp70* TcTr (Fraga et al., 2014), se amplificaron mediante la PCR *hsp70* UDT, 13 muestras de vectores (Figura 15 A), correspondiente a 7 muestras procedentes de México y 6 procedentes de Colombia. Estas muestras se les aplicó la técnica de RFLP *hsp70* UDT, resultado 6 muestras de vectores procedentes de México al UDT TcI y uno mixto TcI/TcIV. Por su parte las muestras procedentes de Colombia 4 correspondieron al TcI, una muestra al TcV o VI y una al TcIII (Figura 15 B y C). De forma general el ensayo de PCR-RFLP *hsp70* UDT permitió tipificar el 65,0% de las muestras de vectores analizadas.

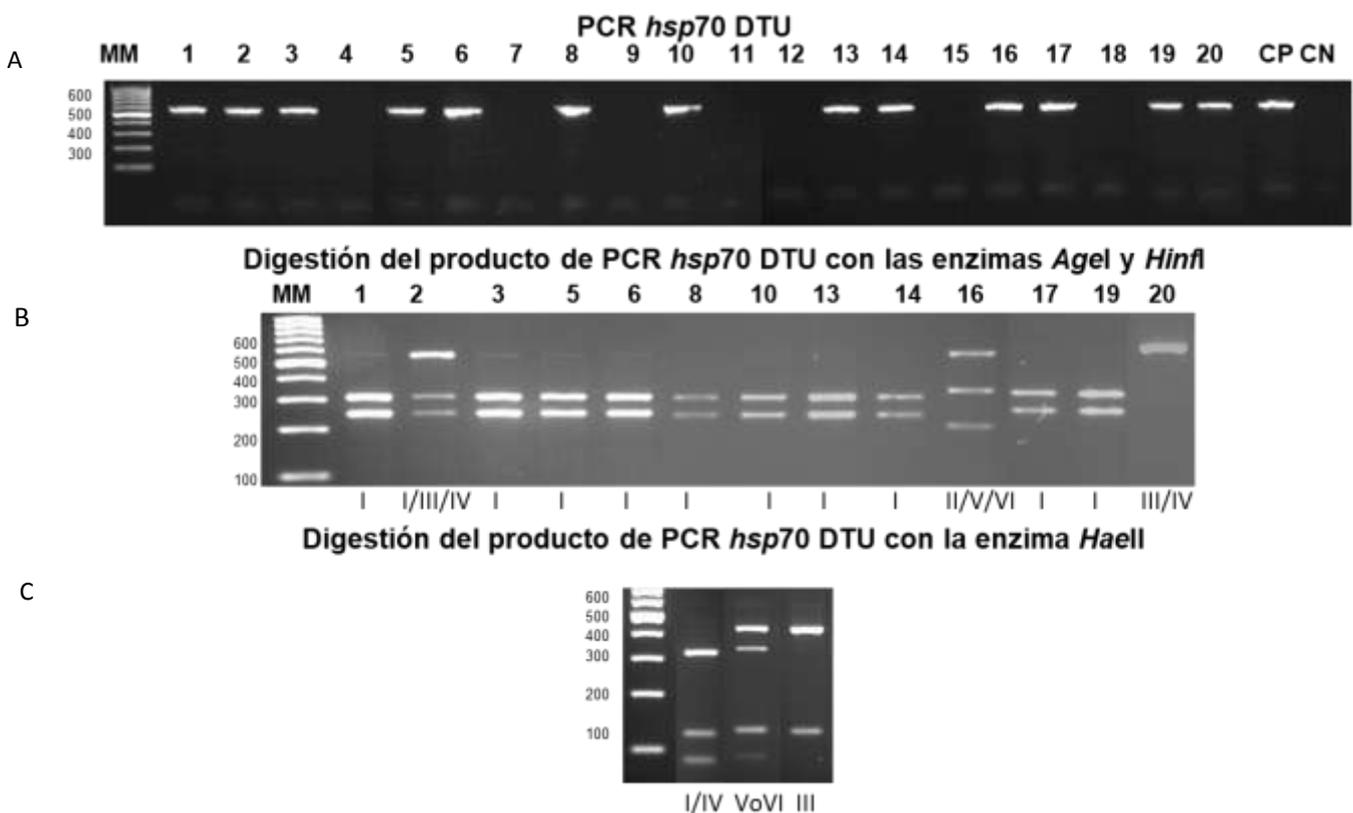


Figura 15. Patrón electroforético de la PCR-RFLP *hsp70* UDT obtenido de ADN procedente de muestras de vectores de México y Colombia. A) PCR *hsp70* UDT. B) RFLP del producto de PCR de 545pb con las enzimas de restricción *Agel* y *HinfI*. C) RFLP del producto de

PCR de 545pb con la enzima de restricción *HaeII*. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Carril 1 al 10 Muestras de vectores procedentes de México; Carril 11 al 20: Muestras de vectores procedentes de Colombia; CN: Control negativo. Debajo de cada gel en número romano el linaje correspondiente según la digestión.

Reservorios: Finalmente al analizar cinco muestras procedentes de reservorios de Colombia, a partir de la positividad al método de la PCRkDNA (121-122) (Sturm et al., 1989) y la PCR dúplex *hsp70* TcTr (Fraga et al., 2014), se amplificaron mediante la PCR *hsp70* UDT, 3 muestras de reservorios (Figura 16 A), Estas muestras se les aplico la técnica de RFLP *hsp70* UDT resultado dos muestras de reservorios TcI y uno TcIV (Figura 16 B y C). De forma general el ensayo de PCR-RFLP *hsp70* UDT permitió tipificar el 60,0% de las muestras de reservorios analizadas.

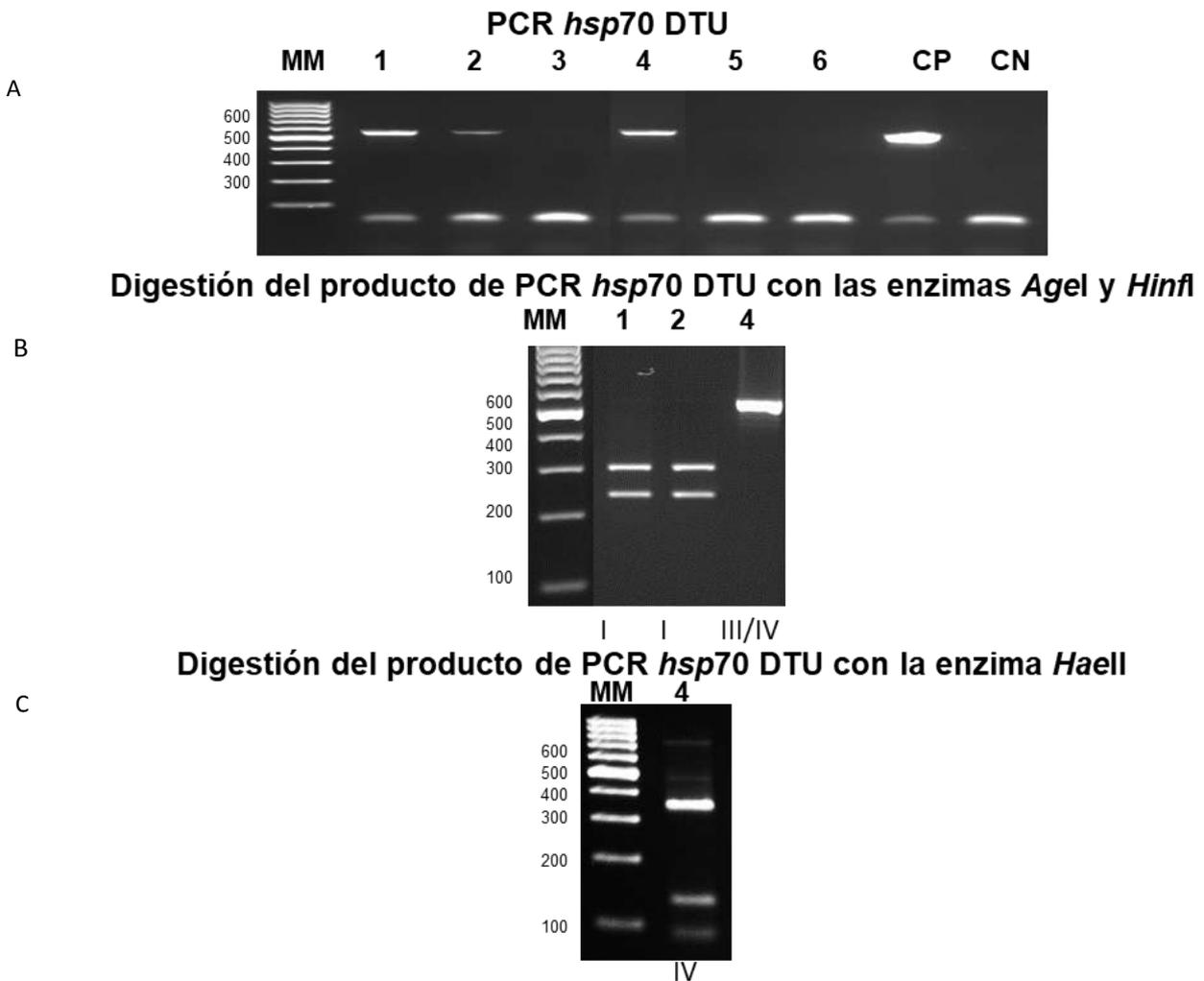


Figura 16. Patrón electroforético de la PCR-RFLP *hsp70* UDT obtenido de ADN procedente de reservorios de Colombia. A) PCR *hsp70* UDT. B) RFLP del producto de PCR de 545pb con las enzimas de restricción *Agel* y *Hinfl*. C) RFLP del producto de PCR de 545pb con la enzima de restricción *HaeII*. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Carril 1 al 6 Muestras de reservorios procedentes de Colombia. CN: Control negativo. Debajo de cada gel en número romano el linaje correspondiente según la digestión.

La tabla 5 resume la tipificación de las muestras clínicas, vectores y reservorios analizados. Los mejores valores de tipificación se obtuvieron al utilizar la muestra de vectores (65%), seguida de reservorios (60%) y finalmente las muestras clínicas de los pacientes (46%), para un valor total de tipificación de la PCR-RFLP *hsp70* UDT de 54.5%.

Tabla 5. Resultados de la tipificación de las UDT de *T. cruzi* utilizando la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT de muestras clínicas, vectores y reservorios.

	PCR-RFLP <i>hsp70</i> UDT	% Tipificación	UDT
Humanos n=30			
Colombia n= 9	4	46,6%	3 Tc-I 1 Tc-II
Bolivia n=10	4		3 Tc-V o VI 1 Tc-I
Belice n=1	1		1 Tc-I
México n= 10	5		3 Tc-I 1 Tc-III 1 Tc-IV
Triatomas n= 20			
México n=10	7	65%	6 Tc-I 1 Mixto (Tc-I-Tc-IV)
Colombia n=10	6		4 Tc-I 1 Tc-V o-VI 1 Tc-III
Reservorios n= 5			

Colombia n=5	3	60%	2 Tc-I 1 Tc-IV
% TIPIFICACIÓN n=55	54,5 %		

6. DISCUSIÓN

En la actualidad, la alta variabilidad genética del *T. cruzi* permite su clasificación en siete linajes diferentes, así: seis UDT (Discrete Typing Units), desde TcI hasta TcVI, y un séptimo genotipo, TcBathán, ha sido descrito (Zingales et al., 2009; Macili et al., 2009b; Zingales, 2018). A partir de esta clasificación, ha sido motivo de estudio, la distribución geográfica de las diferentes UDT, su relación con los ciclos de transmisión, el impacto de la diversidad genética en las manifestaciones clínicas de la EC, en el diagnóstico serológico y en la susceptibilidad a las drogas antiparasitarias utilizadas (Zingales, 2018). De forma general la identificación de las UDT presentes y la diversidad dentro de ellas es importante, ya que diferentes genotipos pueden causar diferentes patologías y circular en diferentes lugares y ciclos de transmisión, afectando los esfuerzos de control, tratamiento y desarrollo de vacunas (Dorn et al., 2017).

Hoy, la fisiopatología de la EC es aún un misterio por resolver y la descripción de los diferentes genotipos de *T. cruzi* sumó una piedra fundamental en el camino hacia la comprensión de esta enfermedad (Nielebock et al., 2020). Por lo tanto, es necesario el esclarecimiento de cuáles UDT de *T. cruzi* están asociadas a las diferentes presentaciones crónicas de la enfermedad de Chagas y sus resultados. Si bien, cualquier linaje de *T. cruzi* puede infectar a humanos, TcI, TcII, TcV y TcVI son las UDT más asociadas a infecciones humanas en ciclos domiciliarios de transmisión en áreas endémicas (Zingales et al., 2012; Messengers et al., 2015). Algunos estudios describen la distribución geográfica de las UDT de *T. cruzi* para identificar asociaciones epidemiológicas entre los genotipos (Carrasco et al., 2012; Bizai et al., 2020). Otros se centran en la dinámica de los parásitos realizando estudios filogeográficos para comprender su evolución

y el riesgo de infección en humanos (Izeta-Alberdi et al., 2016), pero la última actualización de la distribución y epidemiología de las UDT a nivel continental después de la publicada en 2016 por Izeta-Alberdi y colaboradores fue en el meta-análisis desarrollado por Velásquez-Ortiz y colaboradores (2022). En este meta-análisis se presenta una actualización de la distribución de UDT en las Américas incluyendo un mapa de distribución para Tcbat, registrado predominantemente en Colombia y Brasil, su información eco-epidemiológica como el ciclo de transmisión, huéspedes, vectores, y los métodos y marcadores genéticos utilizados para su identificación y genotipado. Este estudio pretende brindar información que conduzca a la estandarización de la identificación de UDT para mejorar las futuras investigaciones con respecto a la epidemiología molecular de la EC, alentando a la comunidad científica a seguir estudiando la epidemiología molecular de *T. cruzi* para el manejo y vigilancia más precisa de la EC en regiones endémicas (Velásquez-Ortiz et al., 2022).

Como consecuencia de la ratificación de la nomenclatura estandarizada para las siete UDT de *T. cruzi* por parte de un comité de expertos (Zingales et al., 2009), y las necesidades investigativas relacionadas con determinar el papel de la diversidad genética y su impacto en aspectos geográficos, eco-epidemiológicos y del desarrollo de la EC su diagnóstico y tratamiento se hizo imperativo desarrollar una estrategia de genotipado confiable que pudiera ser adoptada por la comunidad científica (Zingales et al., 2012). A lo largo de los últimos años, se han desarrollado varios esquemas de tipificación. Primero se propuso (Brise et al., 2009) un sistema de ensayo de PCR basado en la amplificación de regiones particulares del gen SL y 24S α -rDNA (Souto et al., 1996) y 18S rDNA (Clark et al., 1994) en el que los polimorfismos de tamaño de los productos de amplificación eran adecuados para la asignación de *T. cruzi* en cada una de las seis UDT. También se propuso un análisis multilocus PCR-RFLP del polimorfismo genético de 12 loci para el genotipado de UDT (Rozas et al., 2007). Además, se propuso una estrategia de tipificación secuencial de tres marcadores que consiste en la amplificación por PCR del 24S α -rDNA y la PCR-RFLP de la proteína de choque térmico 60 y los loci de glucosa-6-fosfato isomerasa (Lewis et al., 2009). Yeo et al. (2011) y Lauthier et al. (2012) diseñaron esquemas de tipificación de secuencias multilocus (MLST) en los que la información de secuencia de 4 a 10 genes de mantenimiento de una sola copia permitió la resolución de las seis UDT. Se ha publicado un ensayo que utiliza un gen de una sola copia (TcSC5D) seguido de dos reacciones de RFLP (Cosentino et al., 2012). Sin embargo, la mayoría de los ensayos mencionados

anteriormente son complejos de realizar y se han aplicado solo a parásitos cultivados. Otro esquema que utiliza ensayos de PCR anidados permite la tipificación directa de UDT en muestras biológicas (Marcet et al., 2006; Cardinal et al., 2008) y clínicas (Burgos et al., 2007; 2010), pero requiere entre 3 y 9 reacciones de PCR secuenciales. Posteriormente se desarrolló por Cura y colaboradores (2015) un método de PCR en tiempo real MTq-PCR que identifica las seis UDT de *T. cruzi* en una o dos reacciones secuenciales con sensibilidad adecuada para analizar diferentes tipos de muestras biológicas, como las derivadas de vectores triatominos y diferentes tipos de vida silvestre, así como muestras clínicas de pacientes. Sin embargo, aun cuando se han utilizado diferentes estrategias para la identificación de las UDT de *T. cruzi* existen métodos sencillos de genotipificación para identificar la UDT que ahora están disponibles para su uso generalizado en áreas endémicas, es necesario que se continúe investigando para optimizar técnicas más sensibles y simplificadas que permitan la identificación y diferenciación de las UDT para aplicarlas directamente a muestras clínicas y biológicas (Zingales et al., 2012).

En este sentido en este trabajo se evaluó el diseño de una PCR-RFLP *hsp70* UDT, el gen escogido fue el gen que codifica la proteína HSP70 citoplasmática de *T. cruzi*, este gen ha sido ampliamente utilizado para la detección y diferenciación de especies de *Leishmania* a partir de muestras clínicas de las diferentes formas clínicas de la enfermedad y de diferentes orígenes geográficos (García et al. 2007; Fraga et al. 2012; Montalvo et al. 2012, 2014, 2017; Veland et al. 2012), de la misma forma este gen se utilizó en la detección y diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* (Fraga et al., 2014) y el análisis del polimorfismo genético y análisis filogenético basado en este gen al analizar las especies del género *Trypanosoma*, mostro la existencia de sitios parsimoniosamente informativos, lo que habla de que el gen es un marcador molecular apropiado y a partir de él se pueden diseñar métodos moleculares para la identificación y tipificación de especies, subespecies y linajes. En específico dentro de *T. cruzi*, el análisis filogenético mostro cuatro grupos con un alto valor de *bootstrap* correspondiente con TcI, TcIII, TcIV y TcII + TcV + TcVI (Fraga et al., 2016; 2021).

Como se conoce la PCR permite la amplificación exponencial de secuencias específicas de ADN que pueden encontrarse en la muestra en mínimas cantidades, haciendo de esta técnica una herramienta útil para el diagnóstico, siempre y cuando se logre la normalización de los componentes de la reacción. Dicha normalización, constituye un elemento

indispensable cuando esta herramienta se introduce por primera vez en un laboratorio con fines diagnósticos o de investigación. La normalización de la PCR requiere un diseño experimental cuidadoso para evaluar el rendimiento de los reactivos en cuanto a la especificidad, la sensibilidad, la eficiencia y la repetibilidad de la reacción (Asif et al., 2021). Para hacer esto, los investigadores hacen diluciones en serie de sus reactivos de PCR, cambiando una variable a la vez para encontrar las concentraciones óptimas. Además, diferentes temperaturas de alineamiento más allá de la calculada a partir de la composición de la imprimación también pueden mejorar el rendimiento de la reacción. En este sentido la reacción de PCR *hsp70* UDT se normalizó, teniendo en cuenta los parámetros de la reacción con ADN purificado, seleccionándose la concentración óptima de los principales componentes de la reacción: cebadores, cloruro de magnesio y Taq ADN polimerasa, elementos que influyen en la sensibilidad y especificidad de la prueba (Weiss, 1995; Asif et al., 2021).

La elección de los cebadores debe realizarse de forma cuidadosa y habitualmente, es el factor más crítico durante la amplificación. En este trabajo, se utilizaron los cebadores diseñados previamente, teniendo en cuenta la amplificación de un fragmento de alrededor de 500pb, ca y cumpliendo con las características básicas a tener en cuenta con el diseño de cebadores, que son ellas asegurarse que solo exista un sitio de unión al ADN molde, un tamaño: de 18 a 24 pares de base, la composición de bases con un porcentaje de GC de 50-60 para evita regiones ricas en (A+T) y (C+G), evitar tener más de 3 bases GC en los extremos del primer, la temperatura de fusión (T_m) con valores entre 55 y 80 C y asegurarse que no existe una diferencia de T_m mayor de 2 o 3 unidades entre los cebadores (Asif et al., 2021). Los cebadores diseñados presentan las características generales necesarias, así *hsp70* UTD-F tiene una longitud de 23 bases, 61% de GC y la T_m es de 60°C, por su parte el cebador *hsp70* UTD-R tiene una longitud de 22 bases, 64% de GC y la T_m es de 60,4°C. Estos cebadores además no forman estructuras secundarias internas (*hairpin*) o dímeros entre ellos. Su concentración es otro aspecto importante en la mezcla de reacción, pues bajas concentraciones disminuyen el rendimiento y aumentan la especificidad, mientras, concentraciones elevadas provocan lo contrario (Steffen et al., 1999, Lorenz, 2012; Asif et al., 2021). En nuestro caso, se determinó como concentración óptima 1,6µM.

La concentración de $MgCl_2$ es un aspecto importante en la mezcla de reacción y debe ser normalizado cuidadosamente pues diferentes concentraciones pueden conllevar a diferencias significativas en la eficiencia de las reacciones y el rendimiento de los productos de la PCR. Las ADN polimerasas termoestables requieren la presencia de magnesio para actuar como un cofactor durante el proceso de reacción. En ausencia de una adecuada cantidad de Mg^{2+} la enzima se inactiva, y no hay amplificación o hay un bajo rendimiento. Por otra parte, el exceso de este reduce la fidelidad de la enzima, e incrementa el número de amplificaciones inespecíficas, lo cual disminuye la fidelidad de la copia (Williams et al., 1989; Eckert y Kundell, 1990; Ellsword et al., 1993; Lorenz, 2012; Asif et al., 2021). La concentración de magnesio es uno de los reactivos más fáciles de manipular con el mayor impacto en la rigurosidad de la PCR. El rango de concentración recomendado debe estar entre 1- 4 mM, bajo las condiciones normales de reacción, y la concentración habitual, para 200 μM de dNTPs, en un rango de $2 \pm 0,5$ mM (Steffen, 1999, Lorenz, 2012; Asif et al., 2021). En este trabajo, la concentración óptima fue de 2,5 mM de $MgCl_2$.

La concentración de enzima (Taq ADN Polimerasa) es un factor importante a tener en cuenta en la PCR, debido a que tanto altas como bajas concentraciones respecto a la óptima, afectan la eficiencia de la reacción (Steffen et al., 1999; Lorez, 2012; Asif et al., 2021). Para muchos ensayos la cantidad óptima se encuentra entre 0,5 y 2,5 U en 50 μL de volumen final de reacción. Concentraciones superiores disminuyen la especificidad, y se pueden generar artefactos relacionados con la actividad exonucleasa 5'- 3' (Longley et al., 1990; Bell y De Marini, 1991). En nuestro caso, la concentración de 1 U para 25 μL de reacción fue suficiente.

El resto de los componentes de la reacción, dNTPs y tampón de amplificación, se utilizaron a las concentraciones recomendadas. La concentración habitual para los dNTPs es 200 μM , y es fundamental tener una concentración equimolar de los cuatro dNTPs, ya que el desequilibrio, disminuye el rendimiento y favorece la tasa de error de copia. La concentración del tampón de amplificación que se utilizó fue la que recomiendan los fabricantes (Steffen, 1999; Lorez, 2012; Asif et al., 2021).

La eficacia de la unión de los cebadores es un factor muy importante para el éxito y la rigurosidad de la PCR y puede modificarse mediante factores como la constitución química

del tampón (potenciadores de la PCR, codisolventes), concentración de cebadores, concentración de Mg_2^+ y temperatura de hibridación (Markoulatos et al., 2002). La amplificación por la PCR debe optimizarse para alcanzar la temperatura hibridación más baja, donde la reacción sigue siendo específica y no se observan productos inespecíficos. Si la temperatura de hibridación es muy baja se amplifican fragmentos no específicos, si la temperatura de hibridación es muy alta, el rendimiento del producto deseado y, a veces, la pureza se reduce debido a la deficiencia de la unión de los cebadores (Lorenz, 2012; Asif et al., 2021). Como resultado del gradiente de temperaturas realizado en este estudio se definió 65°C como la temperatura óptima.

Luego de la selección de la secuencia blanco y cebadores a evaluar, así como la normalización de la PCR *hsp70* UDT fue imprescindible detectar la menor cantidad posible de parásitos que pudieran encontrarse en las muestras clínicas a ser analizadas. Una vez normalizados los parámetros de la PCR, se determinó la sensibilidad y especificidad analítica. Al evaluar la sensibilidad analítica de la PCR utilizando ADN puro de los seis linajes de *T. cruzi* se obtuvo que la misma es capaz de detectar hasta 0,01pg de ADN (10fg) (0,05 genomas del parásito), según Souza y colaboradores (2011), 100fg de ADN es equivalente a 1 parásito, de ahí que el método es capaz de detectar menos de un parásito para todos los linajes de *T. cruzi*. Demostrándose que los cebadores diseñados pueden amplificar igualmente todos los linajes con muy alta sensibilidad analítica, aunque observamos como resultado amplicones de diferentes intensidades. La sensibilidad analítica para el esquema de PCR convencional utilizado por Burgos y colaboradores (2007) ampliamente utilizado para la identificación de las UDT, osciló entre 100 fg y 10 pg de ADN por tubo de reacción, según la reacción y la UDT analizada, Cura y colaboradores (2015) al utilizar la técnica de PCR en tiempo real múltiple (MTq-PCR) mostraron una sensibilidad analítica que oscilaba entre 1 fg y 1 pg de ADN por tubo de reacción, según la UDT que se analizara.

De forma simultánea, la evaluación de la especificidad analítica mostró el reconocimiento y amplificación de la banda esperada de 545pb para el ADN de *T. cruzi*, no así para las especies de *Leishmania* y *P. falciparum* evaluados. Sin embargo, al estudiar otras especies de *Trypanosomas* se obtuvo la banda de amplificación de alrededor de 545pb en *T. cruzimarinkellei*, *T. rangelyi* y *T. lewisi* a una concentración de 10fg. Sin embargo, al digerir estos productos de amplificación con las enzimas de restricción *Agel* y *Hinfl*, estas enzimas

de restricción no digieren el producto de PCR obtenido, obteniéndose un patrón de amplificación igual a lo que sucede con los linajes TcIII/TcIV, sin embargo al digerir con la enzima *HaeIII* el producto de digestión correspondiente que es capaz de diferenciar TcIII de TcIV, así como *T. lewisi*, que no se digiere este producto de amplificación, sin embargo TcIV, *T. cruzimarinkellei* y *T. rangeli* quedarían dando el mismo patrón de digestión con la enzima *HaeIII*, pero para corroborar el linaje TcIV y descartar *T. cruzimarinkellei* y *T. rangeli* se puede utilizar una digestión con la enzima *HaeIII*, que permite diferenciar claramente a TcIV (250/170/66/59pb) de *T. cruzimarinkellei* (250/236/59pb) y *T. rangeli* (250/99/71/66/59pb).

Estas especies de *Trypanosoma* que se amplifican junto con *T. cruzi*, son necesarias tenerlas en cuenta pues pudieran coexistir junto con *T. cruzi* en reservorios, vectores y humanos. En el caso de *T. lewisi* un parásito no patógeno mundial que se encuentra exclusivamente en ratas, la infección por este parásito suele ser autolimitada en roedores y humanos. En general, la infección por *T. lewisi* en humanos es una infección oportunista de ratas a humanos a través de las pulgas. Sin embargo, se han informado infecciones por *T. lewisi* en humanos, incluido un caso mortal fundamentalmente en Malasia, Tailandia, Gambia e India (Nguyen et al., 2022; Jain et al., 2023), por lo que este en particular no constituye un parásito a tener en cuenta en países endémicos de la EC. Los resultados de amplificación del fragmento esperado para *T. cruzi* basado en el gen *hsp70*, esta dada a la cercanía filogenética a los clados *T. rangeli* y *T. cruzi* que ha sido demostrada por el análisis utilizando el gen *hsp70* (Fraga et al., 2016; 2021), así como por otros autores con los genes SSU-rRNA, gGAPDH, proteasa tipo catepsina L, cyt b, y SL RNA (Maia da Silva et al., 2004, 2007, 2009; Ortiz et al., 2009; Stevens and Gibson, 1999; Stevens and Rambaut, 2001). Por su parte, *T. rangeli* es un protozoo que infecta triatomíneos y mamíferos en América Latina, compartiendo huéspedes con *T. cruzi*, este parásito no causa enfermedades a los humanos, pero es fuertemente patógeno para sus huéspedes invertebrados, lo que aumenta las tasas de mortalidad y afecta el desarrollo de insectos y el éxito reproductivo (Marlière et al., 2022). El análisis basado en el gen *hsp70* identificó a *T. rangeli* como un clado hermano a *T. cruzi* y *T. cruzimarinkellei*, al igual que al utilizar otros marcadores moleculares tales como: SSU-rRNA, proteasa tipo catepsina L, cytB y gGAPDH (Maia da Silva et al., 2004; 2009; Ortiz et al., 2009; Stevens and Gibson, 1999; Stevens and Rambaut, 2001) lo que explica la amplificación de este fragmento de PCR. Finalmente el análisis del gen *hsp70* y el análisis concatenado basado en los genes SSU

rDNA+gGADPH+hsp70 soportan que el clado *T. cruzi* incluyen este clado las seis UDT (Tibayrenc and Ayala, 2012): TcI-TcVI (Miles et al., 2009; Zingales et al., 2012) y dos genotipos relacionados con *T. cruzi* que están relacionados con murciélagos: *Tc-bat* y *T. cruzimarinkellei* (Lima et al., 2012; Marcili et al., 2009), resultados que están en concordancia con los previamente reportados con los genes SSU-rRNA, gGAPDH, cytB y cruzipaina (Cavazzana et al., 2010; Maia da Silva et al., 2009; Lima et al., 2012), y por el análisis de proteómica comparativa (Telleria et al., 2010). Por todo esto *T. rangeli* y *T. cruzimarinkellei* son necesarios identificarlos y diferenciarlos al tener posibilidades de ser amplificados en vectores y reservorios de *T. cruzi* (Marlière et al., 2022).

El algoritmo PCR-RFLP que propusimos y evaluamos basado en el gen *hsp70* permite en dos pasos diferenciar las UDT TcI, TcII, TcIII y TcIV, pero no es posible discriminar las UDT TcV y TcVI. Estos resultados se corresponden con los grupos genéticos obtenidos en el análisis filogenético previamente informado por Fraga y colaboradores (2016; 2021) basado en el gen *hsp70*. Como TcV y TcVI han surgido por un proceso de hibridación más reciente de TcII y TcIII (Brisse et al., 2000; Westenberger et al., 2005; Flores-López y Machado, 2011; Ferreira y Briones, 2012), no sorprende que sus secuencias correspondientes al gen *hsp70* están vinculados a uno de los dos linajes. TcV y TcVI están claramente asociados con la enfermedad de Chagas en humanos países del sur de América del Sur. Sin embargo, algunos casos humanos la infección con TcV y/o TcVI se informó más al norte de Ecuador (Garzón et al., 2002) y Colombia (Guhl y Ramírez, 2013). Se ha demostrado en diferentes estudios que estos linajes están más relacionados con la forma digestiva de la enfermedad (Monje-Rumi et al., 2020). Estas UDT resultaron de al menos un evento de hibridación más reciente, que se estima que ocurrió hace 0,9 millones de años (de Freitas et al., 2006) y muestran una diversidad mínima dentro del linaje (Zingales, 2018).

El porcentaje de tipificación de la PCR-RFLP *hsp70* UDT varió en función de las muestras analizadas. Con relación a los aislamientos provenientes de pacientes, reservorios y vectores, la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT permitió tipificar el 100% de los aislamientos, resultados esperados teniendo en cuenta que se parte de ADN puro con calidad y cantidad suficiente para el análisis por PCR. Resultados similares se han obtenido al utilizar el esquema de genotipificación convencional (Brisse et al., 2001; Cardinal et al., 2008; Burgos et al., 2013) y al utilizar el MTq-PCR donde se pudo tipificar el 93,8% de los aislamientos

procedentes de vectores (n=16) y el 100% de los procedentes de reservorios (n=27) (Cura et al., 2015).

Al analizar el porcentaje de tipificación obtenido de muestras clínicas de pacientes con enfermedad crónica indeterminada el método descrito por nosotros pudo tipificar el 46,6% de las muestras analizadas (14/30). Lo que consideramos un resultado apropiado teniendo en cuenta la baja carga parasitaria que contienen los pacientes en esta fase de la enfermedad. Esta observación puede estar estrechamente relacionada con la sensibilidad de los métodos de tipificación de *T. cruzi* UDT obtenidos directamente de sangre periférica total. Datos obtenidos por Zulantay y colaboradores (2022), como experiencia en al menos dos años de trabajo experimental, indicaron que no es posible genotipar poblaciones circulantes de menos de 10 par. eq./ml. Considerando que un alto porcentaje de individuos con EC crónica presentan una carga parasitaria por debajo de este límite de detección (Saavedra et al., 2016), un gran porcentaje de casos no pudo ser genotipado. Al analizar en muestras de pacientes los porcentajes de tipificación varían en función del algoritmo de tipificación utilizado y la fase en la que se encuentra el paciente así Cura y colaboradores (2015) utilizando la técnica de MTq-PCR tipifico el 29,6% de las muestras de pacientes en fase crónica, sin embargo, el porcentaje de tipificación subió a 62,5% (10/16) y 100% (n=13) para niños con infección congénita y para pacientes en etapa aguda. Valores superiores fueron reportados por Burgos y colaboradores (2007) en pacientes en fase crónica de la enfermedad (77,3%) al utilizar un esquema de tipificación en los que involucra PCR, nest-PCR y PCR en tiempo real. Sin embargo, valores superiores 93,2% han sido reportados por Bizai y colaboradores (2019) al analizar 104 pacientes en fase crónica de la enfermedad utilizando el esquema de tipificación convencional (Diaz et al., 2010), iguales valores han sido reportados por Botempi y colaboradores (2016) al analizar 32 muestras de pacientes con enfermedad en fase crónica. Futuros estudios en donde se evalúen un mayor número de pacientes correspondientes a las diferentes formas de la enfermedad aguda, crónica, congénita y oral.

Con relación a las muestras procedentes de vectores, la PCR-RFLP *hsp70* UDT fue capaz de tipificar el 65% de las muestras analizadas (n= 20). Valores superiores han sido reportados utilizando la técnica de MTq-PCR (80,7%) por Cura y colaboradores (2015), 90,5% de tipificación fue reportado por Pérez y colaboradores (2013) y utilizando el esquema convencional (95,6%) de los triatomíneos estudiados (n=113) (Padilla et al.,

2017). Estudios futuros donde se incrementen el número de triatomíneos a estudiar son necesarios para llegar a conocer la capacidad real de la técnica para identificar las UDT utilizando la técnica normalizada.

Finalmente, el porcentaje de tipificación de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT resulto de 60% al analizar solamente 5 muestras procedentes de Colombia. Resultados similares (61,3% y 62,5%) han sido reportados al estudiar *D. marsupialis* y *Procyon lotor* mediante esquema de PCR en tiempo real y secuenciación y análisis filogenético, respectivamente (Pineda et al., 2021; Majeau et al., 2023). Resultados muy superiores, 93,2% fueron reportados por Cura y colaboradores (2015). Futuros estudios en donde se evalúen un mayor número de reservorios de diferentes orígenes geográficos son de gran utilidad para la validación de la técnica.

De forma general la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT fue capaz de tipificar el 100 % de los aislamientos estudiados y el 54,5% de las muestras de pacientes, vectores y reservorios estudiados (n=55). Mostrando los mejores valores de tipificación a partir de muestras de vectores, seguidos de los reservorios y finalmente de pacientes.

Como se ha descrito se ha asociado la presencia de las UDT con el origen geográficos y los ciclos selváticos y domésticos (Breniere et al., 2016; Zingales, 2018; Velázquez-Ortiz et al., 2022). Se conoce de forma general que TcI tiene una amplia distribución, desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile; esta UDT es la más frecuentemente muestreada en ciclos selváticos, pero también es frecuente en ciclos domésticos y es la UDT dominante responsable de la transmisión de la enfermedad de Chagas en países endémicos ubicados al norte de la cuenca amazónica; los estudios muestran que TcII, V y VI tienen más probabilidades de estar asociados con ciclos domésticos y pacientes con enfermedad de Chagas crónica en los países del Cono Sur y Bolivia; TcIII y IV se muestrean principalmente en los ciclos selváticos de la selva tropical y Tcbat previamente identificado en murciélagos, se ha encontrado recientemente en humanos (Marcili et al., 2000; Cavazzana et al., 2010; Ramírez et al., 2014). Es bien sabido que varias UDT pueden coexistir en el mismo vector y en un solo huésped (Bosseno et al., 2000; DeVillers et al., 2008; Breniere et al., 2012).

En las muestras tipificadas procedentes de Colombia (n=13), utilizando la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT, se encontró que el linaje predominante fue TcI (69,2%) tanto para pacientes, triatomíneos y reservorios, seguido a este, se reportaron los linajes TcII (7,7%), TcIII(7,7%), TcIVoTcVI(7,7%). Las UDT TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcVI y Tcbat han sido reportados en Colombia en pacientes, vectores y reservorios siendo las más prevalentes TcI (79,8%), seguido de TcII (7,33%), Tcbat (5,7%), TcIV (4,12%) y TcVI (1,14%)(Breniere et al., 2016). Otros estudios, han encontrado estos mismos linajes en pacientes, vectores y reservorios y en todos los estudios predomina la presencia de TcI, reportándose además infecciones mixtas de las UDT circulantes que no fueron obtenidos en nuestro estudio quizás por el bajo número de muestras estudiadas (Ramírez et al., 2010; Gulh y Ramírez 2013; Ramírez et al., 2013; Hernández et al., 2016; Rincón-Acevedo et al., 2021).

En el caso de las muestras tipificadas de Bolivia (n=4) procedentes de humanos con EC crónica indeterminada, el linaje predominante encontrado fue el TcVoVI (75 %) y TcI (25%) en este estudio. En este país se ha reportado mayoritariamente las UDT TcI (49,5%) y TcV (42,6%) seguido de TcII (2,7%), TcIV (2,19%), TcIII (2,02%) y TcVI (1,43%) en pacientes, triatomíneos y reservorios. Importante destacar además que en el caso de humanos, el linaje predominante es TcV (68,1%) sobre TcI (23,2%) encontrándose presente de manera minoritaria los linajes TcII, TcIV y TcVI, sin embargo en triatomíneos cambia el predominio y es mayoritaria la UDT TcI(88,8%) sobre TcV(10,5%), reportándose el TcIII de manera minoritaria junto con TcVI e infecciones mixtas, por su parte los reservorios estudiados muestran predominio de TcI (46,2%), seguido por TcIII (37%), y de manera minoritaria TcIV, TcV y TcVI(Breniere et al., 2016). Otros estudios demuestran este comportamiento diferencial entre humanos, triatomíneos y reservorios, con la presencia de infecciones mixtas (Breniere et al., 1995; 2012; Pérez et al., 2013; Martínez-Pérez et al., 2016; Abras et al., 2017; Tavares de Oliveira et al., 2020; Sánchez et al., 2022).

Al analizar las muestras tipificadas procedentes de México (n=12), la UDT predominante resulto la TcI (75%), seguido de TcIII y TcIV, además de una infección mixta TcI+TcIV en triatomíneos. En México hay muy pocos reportes de detección de UDT de *T. cruzi*, sin embargo, Breniere y colaboradores (2016), al analizar 321 muestras de pacientes, vectores y reservorios el linaje predominante fue el TcI (84,7%), reportándose de manera minoritaria los linajes TcII, TcIII, TcIV, TcV e infecciones mixtas (Breniere et al., 2016).

Por su parte, no existen estudios que determinen las UDT circulantes en Belice. Solo ha sido reportado por Dorn y colaboradores (2017), la presencia de la UDT TcI en 7 muestras de *T. dimidiata* y TcII en 2 muestras de esta misma especie de Triatomineo. En nuestro estudio solo una muestra de un paciente con EC crónico indeterminado fue tipificado, resultando ser TcI.

Los resultados de tipificación obtenidos al analizar las muestras de pacientes, vectores y reservorios están relacionados con los linajes y predominios que circulan en México, Colombia, Bolivia y Belice, lo que constituye un elemento a favor en el proceso de evaluación de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT.

Los hallazgos aquí obtenidos promueven a la PCR-RFLP *hsp70* UDT como una valiosa herramienta de laboratorio para la distinción de UDT de *T. cruzi*. Esta técnica constituye una prueba de tipificación molecular práctica y económica para identificar la mayoría de las UDT de *T. cruzi*. Esto proporciona a la comunidad científica una prueba adicional específica, rápida y económica que puede mejorar la comprensión de la correlación entre la UDT de *T. cruzi* y la patología desarrollada durante la infección (Cura et al., 2015).

En un meta-análisis desarrollado por Velásquez-Ortiz y colaboradores (2022), al analizar los métodos moleculares utilizados para la identificación de las UDT de *T. cruzi* encontraron que los métodos basados en PCR han sido los más utilizados, seguidos de las metodologías electroforéticas y la secuenciación. Además, al analizar los algoritmos de genes o conjuntos de genes más comunes utilizados para la identificación y el genotipado del parásito, encontraron que la mayoría de los trabajos utiliza los genes 24S α + COII/SL-IR/cytb/GPI/18 S rRNA/A10/HSP60 seguido de 18 S + SL-IR/COII/A10/cytb/gGAPDH, kDNA maxi/minicircle, kDNA maxi/minicircle y finalmente kDNA maxi/minicircle + SL-IR/cytb/COII/GPI/1f8, en ese orden. Al relacionar los genes más comunes usados con el método de identificación/genotipado, se llegó a la conclusión que los métodos basados en PCR son los más utilizados para la mayoría de los genes, resultados que avalan la utilidad de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT para la identificación de UDT de *T. cruzi* directamente a partir de muestras biológicas. Futuros estudios, donde se aumenten las muestras a estudiar procedentes de las diferentes formas clínicas de EC, triatomineos y reservorios, incluido Tcbat son necesarios con vistas a una mejor evaluación de la técnica propuesta.

CONCLUSIONES

1. Se normalizó la técnica de PCR *hsp70* DTU para la detección de las UDT de *T. cruzi*, que queda introducida en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del IPK.
2. La PCR *hsp70* UDT permite la detección directamente en muestras clínicas con alta sensibilidad y especificidad analítica, lo que la hace una técnica prometedora para la detección y tipificación de *T. cruzi*.
3. Se demostró la utilidad de la PCR-RFLP *hsp70* UDT para la detección y diferenciación de las UDT, al mostrar una concordancia total con los linajes descritos en el panel de cepas de referencia evaluados, lo que permite corroborar que el gen de la *hsp70* citoplasmática y el método propuesto permite la diferenciación de los principales linajes de *T. cruzi*, aunque necesita la combinación con otro método molecular para diferenciar los linajes V y VI.
4. La PCR-RFLP *hsp70* DTU permite la detección directa en muestras clínicas, triatomas y reservorios de los principales linajes del parásito con un porcentaje de tipificación de alrededor del 50 %, por lo que se propone la aplicación de la misma por su bajo costo-efectividad en comparación con otros métodos de caracterización descritos anteriormente.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UTD en un mayor número de muestras clínicas, vectores y reservorios del parásito, incluido Tcbat.
2. Introducir el método PCR mini exón que permite la diferenciación de los linajes TcV y TcVI para de esta forma contra con un protocolo general que basado en dos blancos genéticos permita la diferenciación de todos los linajes de *T. cruzi*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abolis NG, Araújo SM, Toledo MJ, Fernández MA, Gomes ML. *Trypanosomacruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop.* 2011;120(3):167-72.
- Abras A, Gállego M, Muñoz C, Juiz NA, Ramírez JC, Cura CI, Tebar S, et al. Identification of *Trypanosomacruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitol Int.* 2017;66(2):83-88.
- Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol.* 2011;96(6):434-42.
- Angheben A, Buonfrate D, Cruciani M, Jackson Y, Alonso-Padilla J, Gascon J, et al. Rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in at-risk populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(5):e0007271.
- Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world. *Eur J Int Med.* 2017; S0953-6205(17): 30177-30182.
- Antinori S, Galimberti L, Grande R, Ricaboni D, Sala S, Giacomet V, et al. Family cluster of Chagas disease among Bolivian immigrants in Italy: High rate of maternal-fetal transmission. *Travel Med Infect Dis.* 2022;49:102370.
- Apt B Werner, Heitmann G Ingrid, Jercic L M. Isabel, Jofré M Leonor, Muñoz C. del V Patricia, Noemí H Isabel et al. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev. chil. infectol.* 2008; 25(3): 189-193..
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2002a; 49:42-43.
- Arisue N, Sánchez LB, Weiss LM, Müller M, Hashimoto T. Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol Int.* 2002b; 51:9-16

- Asif S, Khan M, Arshad M W, Shabbir M I. PCR Optimization for Beginners: A Step by Step Guide. Res Mol Med (RMM) 2021; 9 (2) :81-102
- Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. J Clin Microbiol 1993; 31: 2421-6.
- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol 1991; 48: 211-21.
- Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. Parasitology. 2000; 120: 513-26.
- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. Lancet 2003; 362:1469-80.
- Basile L, Jansa JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. Euro Surveill. 2011;16(37):19968.
- Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SC. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. Int J Infect Dis. 2010;14(11):e974-7.
- Bell DA, De Marini DM. Excessive cycling converts PCR products to random length higher molecular fragments. Nucleic Acid Res 1991; 19:5079.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. JAMA. 2007 14;298(18):2171-81.
- Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. Clin Infect Dis. 2009;49(5):e52-4
- Bern C, Montgomery SP. Recognizing and reducing the risks of Chagas disease in travelers. J Travel Med. 2008;15(5):385.
- Bezerra CM, Cavalcanti LP, Souza Rde C, Barbosa SE, Xavier SC, Jansen AM, et al. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga area colonised by *Triatoma brasiliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(7):887-98.

- Bittencourt AL, Sadigursky M, Barbosa HS. Doença de Chagas congênita. Estudo de 29 casos [Congenital Chagas' disease. Study of 29 cases]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1975;17(3):146-59.
- Bizai ML, Romina P, Antonela S, Olivera LV, Arias EE, Josefina DC, et al. Geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes detected in chronically infected people from Argentina. Association with climatic variables and clinical manifestations of Chagas disease. *Infect Genet Evol*. 2020;78:104128.
- Blum-Domínguez S, Espinoza B, Martínez-Martínez I, Maldonado-Velázquez G, Tamay-Segovia P. Hallazgo de infección con *Trypanosoma cruzi* sin evidencia serológica. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2011;49(5):537-9.
- Bontempi IA, Bizai ML, Ortiz S, Manattini S, Fabbro D, Solari A, Diez C. Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. *Infect Genet Evol*. 2016; 43: 123–129.
- Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, Brenière SF. *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp Parasitol*. 1996; 83: 275-82.
- Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2010;10:337.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. 1973; 27:347-82.
- Brener Z. Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. *Ann Soc Belg Med Trop* 1985; 65: 9-13.
- Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1971; 13: 171-8.
- Brenière SF, Bosseno MF, Noireau F, Yacsik N, Liegeard P, Aznar C, Hontebeyrie M. Integrated study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(3):289-95.
- Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yaksic N, et al. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 179-84.
- Brenière SF, Lopez J, Vargas F, Barnabe C. Genetic variability and microdistribution of *Triatoma infestans* genotypes and *Trypanosoma cruzi* clones in Arequipa region (Peru). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997; 92: 401-8.

- Brenière SF, Morochi W, Bosseno MF, Ordonez J, Gutierrez T, Vargas F, Yaksic N, Noireau F. *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. *Acta Trop.* 1998; 71: 269-83.
- Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10, e0004792.
- Brenière SF, Waleckx E, Magallón-Gastélum E, Bosseno MF, Hardy X, Ndo C, et al. Population genetic structure of *Meccus longipennis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vector of Chagas disease in West Mexico. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):254-62.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further support the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001;31(11):1218-26.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterized amplified region markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000; 111:95–105.
- Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL. How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(10):e2476.
- Bua J, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(10):623-8.
- Burgos JM, Altchek J, Bisio M, Duffy T, Valadares HMS, Seidenstein ME, et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing Congenital Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2007; 7:1319–1327
- Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010; 51:485–495.
- Burgos JM, Risso MG, Brenière SF, Barnabé C, Campetella O, Leguizamón MS. Differential distribution of genes encoding the virulence factor trans-sialidase along *Trypanosoma cruzi* Discrete typing units. *PLoS One.* 2013;8(3):e58967.

- Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosomacruzi* invasion. *Cell Microbiol.* 2002 Nov;4(11):701-11. doi: 10.1046/j.1462-5822.2002.00226.x. PMID: 12427093.
- Burmeister, H., 1835. *Handbuch der Entomologie*. 2, Abt. I, ii + 400 + 4 pp., 2 est. (Schnabelkerfe, Rhyngota). Berlin.
- Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Infect Dis* 2014; 209:150-62.
- Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:331-5.
- Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, Bula I, Girona-Llobera E, Jimenez-Marco T. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion.* 2015;55(6):1249-55.
- Candia-Puma MA, Machaca-Luque LY, Roque-Pumahuanca BM, Galdino AS, Giunchetti RC, Coelho EAF, Chávez-Fumagalli MA. Accuracy of Diagnostic Tests for the Detection of Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel).* 2022 10;12(11):2752.
- Carbajal-de-la-Fuente AL, Sánchez-Casaccia P, Piccinali RV, Provecho Y, Salvá L, Meli S, et al. Urban vectors of Chagas disease in the American continent: A systematic review of epidemiological surveys. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16(12):e0011003.
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, et al. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol.* 2008;38(13):1533-43.
- Carlier Y, Altcheh J, Angheben A, Freilij H, Luquetti AO, Schijman AG, et al. Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(10):e0007694.
- Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, Martínez CE, et al. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(6):e1707.
- Castillo-Castañeda A, Patiño LH, Muñoz M, Ayala MS, Segura M, Bautista J, Shaban MV, Paniz-Mondolfi A, Ramírez JD. Amplicon-based next-generation sequencing reveals the co-existence of multiple *Leishmania* species in patients with visceral leishmaniasis. *Int J Infect Dis.* 2022;115:35-38.

- Cavazzana Jr M, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, et al. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int. J. Parasitol.* 2010;40:345–355.
- Chancey RJ, Edwards MS, Montgomery SP. Congenital Chagas Disease. *Pediatr Rev.* 2023;44(4):213-221.
- Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JFJ, Ortega-Pacheco A, Hernández-Cortazar IB, Cigarroa-Toledo N, Jiménez-Coello M. Combined use of real-time PCR and serological techniques for improved surveillance of chronic and acute American trypanosomiasis in dogs and their owners from an endemic rural area of Neotropical Mexico. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis.* 2022;2:100081.
- Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen.* 2015;20(1):22-35.
- Chiaromonte MG, Frank FM, Furer GM, Taranto NJ, Margni RA, Malchiodi EL. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infections suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. *Acta Trop.* 1999;72(3):295-308.
- Chin-Hong PV, Schwartz BS, Bern C, Montgomery SP, Kontak S, Kubak B, Morris MI, et al. Screening and treatment of Chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the Chagas in transplant working group. *Am J Transplant.* 2011;11(4):672-80.
- Cicora F, Escurra V, Bibolini J, Petroni J, González I, Roberti J. Cerebral trypanosomiasis in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* 2014;16(5):813-7.
- Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variants in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 66: 175-179.
- Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47(6):747-55.
- Connors EE, Vinetz JM, Weeks JR, Brouwer KC. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Trop.* 2016; 156:68-78.
- Corredor Arjona Augusto. Enfermedad de Chagas: 90 Años Después. *Rev. salud pública.* 1999; 1(3): 242-244.
- Corrêa RR, Espínola HN. Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral. Ceará. *Arquivo de Higiene e Saúde Publica* 29: 115-127, 1964.

- Cuba Cuba, CS. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1998; 31 (2).
- Cura C, Schijman AG. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. Revista Española de Salud Pública. 2013; 6:9-16.
- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, et al. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 19. 9(5):e0003765.
- D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, Chiari E, Galvão LM. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. J Clin Microbiol. 2009; 47:1718–1725
- Dario MA, Andrade TES, Dos Santos CB, Fux B, Brandão AA, Falqueto A. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* samples derived from *Triatoma vitticeps* and *Panstrongylus geniculatus* of the Atlantic rainforest, southeast Brazil. Parasite. 2018;25:59.
- de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2006; 2(3):e24.
- de Fuentes-Vicente JA, Gutiérrez-Cabrera AE, Flores-Villegas AL, Lowenberger C, Benelli G, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. Acta Trop. 2018;183:23-31.
- de Paiva VF, Belintani T, de Oliveira J, Galvão C, da Rosa JA. A review of the taxonomy and biology of *Triatominae* subspecies (Hemiptera: Reduviidae). Parasitol Res. 2022;121(2):499-512.
- Devillers H, Lobry JR, Menu F. An agent-based model for predicting the prevalence of *Trypanosoma cruzi* I and II in their host and vector populations. J Theor Biol. 2008;255(3):307-15.
- Dias JCP. Natural history of Chagas' disease. Arq Bras Cardiol 1995; 65: 359–66.
- Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. Am J Trop Med Hyg 1992; 46: 616-23.
- Diosque P, Tomasini N, Lauthier JJ, Messenger LA, Monje Rumi MM, Ragone PG, et al. Optimized multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8(8):e3117.

- Dorn PL, McClure AG, Gallaspy MD, Waleckx E, Woods AS, Monroy MC, Stevens L. The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(9):e0005878.
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(1):e2000.
- Echeverría LE, Marcus R, Novick G, Sosa-Estani S, Ralston K, Zaidel EJ, et al. WHF IASC Roadmap on Chagas Disease. Glob Heart. 2020 Mar 30;15(1):26.
- Echeverría LE, Rojas LZ, Rueda-Ochoa OL, Gómez-Ochoa SA, González Rugeles CI, Díaz ML, Marcus R, Morillo CA. Circulating *Trypanosoma cruzi* load and major cardiovascular outcomes in patients with chronic Chagas cardiomyopathy: a prospective cohort study. Trop Med Int Health. 2020;25(12):1534-1541.
- Echeverría LE, Rojas LZ, Rueda-Ochoa OL, Gómez-Ochoa SA, González Rugeles CI, Díaz ML, Marcus R, Morillo CA. Circulating *Trypanosoma cruzi* load and major cardiovascular outcomes in patients with chronic Chagas cardiomyopathy: a prospective cohort study. Trop Med Int Health. 2020;25(12):1534-1541.
- Eckert K, Kundel T. High fidelity DNA synthesis by the thermophilic DNA polymerase. Nucleic Acid Res 1990; 18:3739-44.
- Ellsworth D, Rittenhouse K, Honeycutt R. Artifactual variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA banding patterns. Biotechniques 1993; 14:214-7.
- Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, Streiger M, Sosa-Estani S. Trypanocidal treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(11):e3312.
- Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M, Amicone NA. Trypanocidal treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40(1):1-10.
- Ferreira, R.C., Briones, M.R. Phylogenetic evidence based on *Trypanosoma cruzi* nuclear gene sequences and information entropy suggests that inter-strain intragenic recombination is a basic mechanism underlying the allele diversity of hybrid strains. Infect. Genet. Evol. 2012; 12: 1064–1071.

- Ferrer E, Lares M, Viettri M, Medina M. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas [Comparison between immunological and molecular techniques for the diagnosis of Chagas disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(5):277-82.
- Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(3):125-131.
- Flores-Lopez, C.A., Machado, C.A. Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2011; 5:e1272.
- Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev*. 2007; 31:359–377.
- 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; 43:165-72.
- Fraga J, Fernandez-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* using heat-shock protein 70 polymorphisms. *Trop Med Int Health*. 2014; 19 (2):195–206.
- Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol*. 2010; 10: 238–245.
- Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin JC, Requena JM. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infect Genet Evol*. 2013; 18: 229–237.
- Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild A, Valencia BM, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the new world. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 74:142–150.
- Fraga J, Montalvo Álvarez AM, Van der Auwera G, Dujardin JC, Requena JM, Deborggraeve S, et al. Aportes a la evolución y clasificación taxonómica de los géneros de importancia médica de la familia Trypanosomatidae basado en el análisis filogenético del gen de la proteína de choque térmico 70. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 2021, 11(1), e819.
- Francisco AF, Lewis MD, Jayawardhana S, Taylor MC, Chatelain E, Kelly JM. Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and

- Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive In Vivo Imaging. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4653-61.
- Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 2005; 35:411–417.
- García L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*. 2004; 42:2294–2297
- García-Huertas P, Cardona-Castro N. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. *Biomed Pharmacother*. 2021;142:112020.
- Garzón EA, Barnabé C, Córdova X, Bowen C, Paredes W, Gómez E, Ouaisi A, Tibayrenc M, Guevara AG. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic Chagas patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(4):378-82.
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):22-7.
- Gil J, Pavia P, Montilla M, Florez AC, Quintero C, Mercado M, et al. Comparison of a PCR test based on the histone H2A/SIRE genes with classical serological tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in Colombian patients. *Biomedica* 2007; 27: 83-91.
- Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:115-21.
- Gómez-Ochoa SA, Rojas LZ, Echeverría LE, Muka T, Franco OH. Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Glob Heart*. 2022; 24;17(1):59.
- Guerri-Guttenberg RA, Grana DR, Ambrosio G, Milei J. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! *Eur Heart J*. 2008;29(21):2587-91.
- Guhl F, Auderheide A, Ramírez JD. From ancient to contemporary molecular epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Int J Parasitol*. 2014;44(9):605-12.
- Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Arch Med Res* 2002; 33: 362-70.
- Guhl F, Ramírez JD. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infect Genet Evol*. 2013;20:148-54.

- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*Tejera, 1920: an updated review. MemInst Oswaldo Cruz 2003; 98: 435-42.
- Gurevitz JM, Gaspe MS, Enriquez GF, Provecho YM, Kitron U, Gürtler RE. Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. PLoSNeglTropDis. 2013 Apr 11;7(4):e2158.
- Vallejo GA. Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *Trypanosomacruzi* y *Trypanosomarangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis americana. Actualidades Biológicas. 1998;20:68.
- Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, Kunz R, Vist G, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction- GRADE evidence profiles and summary of findings tables. J Clin Epidemiol. 2011;64(4):383-94.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science. 2002; 295:1852–1858.
- Hernández C, Cucunubá Z, Flórez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, León C, Ramírez JD. Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. PLoSNeglTropDis. 2016 Sep 20;10(9):e0004997.
- Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Clin Microbiol Rev. 2001 Oct;14(4):659-88.
- Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. Parasites Vectors. 2013; 6:112.
- Hoare, C.A. The Trypanosomes of Mammals. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1972.
- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosomacruzi*: a systematic review and meta-analysis. BJOG. 2014;121(1):22-33.
- Hughes AL, Piontkivska H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S-rRNA and protein phylogenies. Kinetoplastid Biol. Dis. 2003; 2,15.
- Huprikar S, Bosserman E, Patel G, Moore A, Pinney S, Anyanwu A, et al. Donor-derived *Trypanosomacruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. Am J Transplant. 2013;13(9):2418-25.

- Iglesias Rodríguez IM, Miura S, Maeda T, Imai K, Smith C, VasquezVelasquez C, Honda S, Hirayama K. Analysis of the Chagas disease situation in Japan: a cross-sectional study and cost-effectiveness analysis of a Chagas disease screening program. *Lancet Reg Health West Pac.* 2022;31:100574.
- Iglesias-Rus L, Boquete T, Romay-Barja M, Benito A, Jordan B, Blasco-Hernández T. Diagnostic pathways of Chagas disease in Spain: a qualitative study. *BMC Public Health.* 2023;23(1):332.
- Irish A, Whitman JD, Clark EH, Marcus R, Bern C. Updated Estimates and Mapping for Prevalence of Chagas Disease among Adults, United States. *Emerg Infect Dis.* 2022;28(7):1313-1320.
- Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña CN, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):631.
- Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2010;51(10):e69-75.
- Jain P, Goyal V, Agrawal R. An atypical *Trypanosoma lewisi* infection in a 22-day-old neonate from India: An emergent zoonosis. *Indian J Pathol Microbiol.* 2023;66(1):199-201.
- Jansen AM, Xavier SC, Roque AL. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 2015;151:1-15.
- Jansen AM, Xavier SCDC, Roque ALR. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):502.
- Joselín DV, Ignacio M, Ángel RM, Gabriel GG, Rodrigo Isaias LV, Víctor SC, Jorge FN, Jose ÁC, Bertha E. Multiple Discrete Typing Units of *Trypanosoma cruzi* Infect Sylvatic *Triatoma dimidiata* and *Panstrongylus rufotuberculatus* in Southeast Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2021;105(4):1042-1049.
- Justi SA, Galvão C. The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends Parasitol* 2017; 33:42-52.
- Kelly S, Ivens A, Manna PT, Gibson W, Field MC. A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. *Sci Data* 2014; 1: 140024.
- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1171-5.

- Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, Radhakrishna S, Leiby D, Herron R, Mone T, Hunter R, Kuehnert M; Chagas Disease in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. Clin Infect Dis. 2009;48(11):1534-40.
- La Hoz RM. Transplantation for chagas' disease: closing the knowledge gap. Curr Opin Infect Dis. 2022;35(5):397-403.
- Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology. 2007; 134:339–350
- Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. Lancet Infect Dis 2010; 10: 556-70.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool 1980; 27:37-58.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Gaunt MW, Yeo M, Carrasco HJ, Miles MA. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. Int J Parasitol. 2009; 39:1305–1317.
- Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J Exp Med. 1990; 171:401-13.
- Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. Front Public Health. 2019;7:166.
- Lilioso M, Folly-Ramos E, Rocha FL, Rabinovich J, Capdevielle-Dulac C, Harry M, et al. High *Triatoma brasiliensis* Densities and *Trypanosoma cruzi* Prevalence in Domestic and Peridomestic Habitats in the State of Rio Grande do Norte, Brazil: The Source for Chagas Disease Outbreaks? Am J Trop Med Hyg. 2017 Jun;96(6):1456-1459.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto M, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Trop. 2015; 151:166–177.

- Lima Vdos S, Xavier SC, Maldonado IF, Roque AL, Vicente AC, Jansen AM. Expanding the knowledge of the geographic distribution of *Trypanosoma cruzi*TcII and TcV/TcVI genotypes in the Brazilian Amazon. PLoS One. 2014; 9(12):e116137.
- Lima, L., Ortiz, P.A., da Silva, F.M., Alves, J.M., Serrano, M.G., Cortez, A.P., Alfieri, S.C., Buck, G.A., Teixeira, M.M.G. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. PLoS ONE. 2012; 7, e38385
- Lima-Oliveira TM, Fontes FVHM, Liliuso M, Pires-Silva D, Teixeira MMG, Meza JGV, Harry M, et al. Molecular eco-epidemiology on the sympatric Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrocchiae*: Ecotopes, genetic variation, natural infection prevalence by trypanosomatids and parasite genotyping. Acta Trop. 2020;201:105188.
- Liu Q, Zhou XN. Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. Infect Dis Poverty. 2015 28;4:60.
- Longley MS, Bennett SE, Mosbaug DW. Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* RNA polymerase. Nucleic Acid Res 1990; 18:7317-22.
- Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. J Vis Exp. 2012;(63):e3998.
- Luquetti AO, Tavares SB, Siriano Lda R, Oliveira RA, Campos DE, de Moraes CA, de Oliveira EC. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):369-76.
- Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JC, Coura JR, Machado-Coelho GL, et al. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013; 108:873-80.
- Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana Jr, M, Ortiz PA, Campaner M, et al. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. Acta Trop. 2009; 109:199–207.
- Maia da Silva F, Rodrigues AC, Campaner M, Takata CS, Brigido MC, et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. Parasitology. 2004; 128:283–294.

- Majeau A, Cloherty E, Anderson AN, Straif-Bourgeois SC, Dumonteil E, Herrera C. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* infecting raccoons (*Procyon lotor*) in 2 metropolitan areas of southern Louisiana: implications for parasite transmission networks. *Parasitology*. 2023;150(4):1-8.
- Marcili A, Lima L, Valente VC, Valente SA, Batista JS, Junqueira AC, et al. Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIc: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infect Genet Evol*. 2009;9(6):1265-74.
- Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira AC, da Silva FM, Pinto AY, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol*. 2009;39(5):615-23.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009; 136:641–655.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:47-51.
- Marlière NP, Lorenzo MG, Guarnieri AA. *Trypanosoma rangeli* infection increases the exposure and predation endured by *Rhodnius prolixus*. *Parasitology*. 2022;149(2):155-160.
- Martínez I, Cervantes-Landín A, Espinoza B. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. *Gac Med Mex*. 2013;149(3):363-5.
- Martinez-Perez A, Poveda C, Ramírez JD, Norman F, Gironés N, Guhl F, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. *Acta Trop*. 2016;157:145-50.
- Martins K, Andrade C de M, Barbosa-Silva AN, do Nascimento GB, Chiari E, Galvão LM, da Câmara AC. *Trypanosoma cruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int J Infect Dis*. 2015; 39:68-75.
- Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(8):995-1029.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel

- research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*.2009; 136: 1509–1528.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Sao Avilés A, Almirante B. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6125-31.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas [Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(2):132-8.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014;371(10):966.
- Monje-Rumi MM, Florida-Yapur N, Zago MP, Ragone PG, Pérez Brandán CM, Nuñez S, et al. Potential association of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. *Infect Genet Evol*. 2020;84:104329.
- Montalvo AM, Fraga J, El Safi S, Gramiccia M, Jaffe CL, Dujardin JC, Van der Auwera G. Direct *Leishmania* species typing in Old World clinical samples: evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2014; 80:35–39.
- Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012, 31: 1453-61.
- Montalvo AM, Fraga J, Tirado D, Blandón G, Alba A, Van der Auwera G, Vélez ID, Muskus C. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitol Res*. 2017; 116(7):1843-1848.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295-306.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1477-82.
- Muñoz-San Martín C, Apt W, Zulantay I. Real-time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. *Infect Genet Evol*.2017; 49:300–8.
- Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31 Suppl 1:26-34.

- Murillo-Solano C, López-Domínguez J, Gongora R, Rojas-Gullosa A, Usme-Ciro J, Perdomo-Balaguera E, Herrera C, Parra-Henao G, Dumonteil E. Diversity and interactions among triatomine bugs, their blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* in the Sierra Nevada de Santa Marta in Colombia. *Sci Rep*. 2021;11(1):12306.
- Murthy VK, Dibbern KM, Campbell DA. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 237-43.
- Navarro Martínez J, Keituqwa Yáñez I, Nicolás Franco S. Cardiac resynchronization therapy rapid response in a dilated cardiomyopathy due to Chagas disease. *Med Intensiva (Engl Ed)*. 2022; 46(12):726-727.
- Neiva A 1911. Contribuição para o estudo dos hematofagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de *Triatoma Brazil-Médico* 25: 461-462.
- Nguyen LKH, Koizumi N, Ung THT, Le TT, Hirayama K, Hasebe F, et al. Detection of *Trypanosoma lewisi* DNA from *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* in Hanoi, Vietnam. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2022;22(2):159-161.
- Nielebock MAP, Moreira OC, Xavier SCDC, Miranda LFC, Lima ACB, Pereira TOJS, et al. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243008.
- Organización Panamericana de la Salud. Síntesis de evidencia: Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Panam Salud Publica*. 2020;44:e28.
- Ortiz PA, Maia da Silva F, Cortez AP, Lima L, Campaner M, Pral EM, Alfieri SC, Teixeira, M.M.G. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta Trop*. 2009; 112, 249–259.
- Otálora-Luna F, Pérez-Sánchez AJ, Sandoval C, et al. Evolution of hematophagous habit in Triatominae (Heteroptera: Reduviidae). *Rev. Chil. de Hist. Nat*. 2015; 88:4.
- Paba J, Ricart CA, Fontes W, Santana JM, Teixeira AR, Marchese J, et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. *J Proteome Res*. 2004; 3:517-24.
- Pacheco L V, Santana LS, Barreto BC, Santos E De S, Meira CS. Oral transmission of Chagas disease: A literature review. *Research, Society and Development*. 2021; 10:(2): e31910212636.

- Padilla CP, Alvarado U, Ventura G, Luna-Caipo D, Suárez M, Tuñoque JR, et al. Identifying *Trypanosomacruzi* discrete typing units in triatomines collected in different natural regions of Perú. *Biomedica*. 2017;37(0):167-179.
- Pérez E, Monje M, Chang B, Buitrago R, Parrado R, Barnabé C, Noireau F, Brenière SF. Predominance of hybrid discrete typing units of *Trypanosomacruzi* in domestic *Triatoma infestans* from the Bolivian Gran Chaco region. *Infect Genet Evol*. 2013; 13:116-23.
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391(10115):82-94.
- Pérez-Molina JA, Pérez-Ayala A, Moreno S, Fernández-González MC, Zamora J, López-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(6):1139-47.
- Pinazo MJ, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):390-5.
- Pinazo MJ, Thomas MC, Bustamante J, Almeida IC, Lopez MC, Gascon J. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110:422-32.
- Pineda VJ, González KA, Perea M, Rigg C, Calzada JE, Chaves LF, Vásquez V, Samudio F, Gottdenker N, Saldaña A. Surveillance and genotype characterization of zoonotic trypanosomatidae in *Didelphis marsupialis* in two endemic sites of rural Panama. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2021;17:20-25.
- Pinto A, Pett S, Jackson Y. Identifying Chagas disease in Australia: an emerging challenge for general practitioners. *Aust Fam Physician*. 2014;43(7):440-2.
- Pinto AY, Ferreira AG, Jr., Valente Vda C, Harada GS, Valente SA. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica* 2009; 25: 77-83.
- Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosomacruzi* genotypes circulating in chronic Chagas patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e899.
- Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Floréz AC, Zambrano P, Guhl F. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2041
- Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, Guhl F. *Trypanosoma* species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect Genet Evol*. 2014;22:250-6.

- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
- Rassi A, Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26: 275-91.
- Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Lopez MC, Alonso C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 271-80.
- Requena JM, Lopez MC, Jimenez-Ruiz A, de la Torre JC, Alonso C. A head-to tail tandem organization of *hsp70* genes in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16:1393–1406.
- Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DA, Gascon J, Muñoz J. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(2):e0003540.
- Riarte A, Luna C, Sabatiello R, Sinagra A, Schiavelli R, De Rissio A, et al. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. *Clin Infect Dis*. 1999;29(3):561-7.
- Ribeiro I, Sevcsik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO, Chang S, Pecoul B. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(7):e484.
- Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, Portús M. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;86(3):412-6.
- Rincón-Acevedo CY, Parada-García AS, Olivera MJ, Torres-Torres F, Zuleta-Dueñas LP, Hernández C, Ramírez JD. Clinical and Epidemiological Characterization of Acute Chagas Disease in Casanare, Eastern Colombia, 2012-2020. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:681635.
- Rozas M, De Doncker S, Adai V, Coronado X, Barnabe C, Tibyarenc M, Solari A, Dujardin, JC. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment– length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis*. 2007; 195:1381–1388
- Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica*. 2014; 34: 631-41.

- Salvador R, Aridgides D, PereiraPerri M. Parasite-derived neurotrophic factor/transsialidase of *Trypanosoma cruzi* links neurotrophic signaling to cardiac innate immune response. *Infect Immun* 2014; 82:3687-96.
- Salvatella R, Irabedra P, Castellanos LG. Interruption of vector transmission by native vectors and "the art of the possible". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(1):122-5.
- Samuels AM, Clark EH, Galdos-Cardenas G, Wiegand RE, Ferrufino L, Menacho S, et al. Epidemiology of and impact of insecticide spraying on Chagas disease in communities in the Bolivian Chaco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2358.
- Sanchez L, Messenger LA, Bhattacharyya T, Gilman RH, Mayta H, Colanzi R, et al. Congenital Chagas disease in Santa Cruz Department, Bolivia, is dominated by *Trypanosoma cruzi* lineage V. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2022;116(1):80-84.
- Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and non-endemicity. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2506-12.
- Sangenito LS, Branquinha MH, Santos ALS. Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009-2018) Survey. *Trop Med Infect Dis*. 2020;5(2):88.
- Santana RA, Magalhães LK, Prestes SR, Maciel MG, Da Silva GA. *Trypanosoma cruzi* strain TCI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit. Vectors* 2014; 7: 267
- Schijman AG, Alonso-Padilla J, Longhi SA, Picado A. Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: from field to laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117:e200444.
- Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(3):441-9.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e931.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):14-21.

- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl 1:75-85.
- Schoch CL, Ciuffo S, Domrachev M, Hottel CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020;2020:062.
- Shikanai-Yasuda MA, Sátolo CG, Carvalho NB, Atala MM, Ferrufino RQ, Leite RM, et al. Interdisciplinary approach at the primary health care level for Bolivian immigrants with Chagas disease in the city of São Paulo. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005466.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):845-52.
- Silva TRM, Rios TG, do Nascimento Ramos CA, Scofield A, Lima TARF, Alves LC, Ramos RAN, de Carvalho GA. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs of the triatomine species in a Chagas disease endemic area. *J Parasit Dis*. 2022;46(1):64-71.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 2006; 22, 168–174.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83: 141-52.
- Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol* 1999; 91: 306-14.
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62: 45-52.
- Souza RT, Lima FM, Barros RM, Cortez DR, Santos MF, Cordero EM, et al. 2011. Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One* 6:e23042.
- Stål C. Enumeratio Reduviinorum Americae. In: Enumeratio Hemipterorum. 2. *Kungliga Svenska Vetenskaps Akademiens Handlingar*. 1872;10(4): 1-159.
- Stål C. Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. *Berl. Ent. Zeitschr*. 1859, 3, 99–117.
- Steffen C, Ankenbaver W, Poaver-Hofmann R, Bye S, Eisen D, Frey B, et al. En: Steffen C, ed. *PCR Application Manual*. 2nd ed. Mannheim: Roche Diagnostics 1999. p.10.

- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol* 2001; 1: 143–150.
- Stevens, J.R., Gibson, W. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol.Today*.1999; 15: 432–437.
- Streiger ML, del Barco ML, Fabbro DL, Arias ED, Amicone NA. Estudo longitudinal e quimioterapia específica em crianças, comdoença de Chagas crônica, residentes em área de baixaendemicidade da República Argentina. *RevSocBrasMedTrop*. 2004; 37(5):365-75.
- Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol BiochemParasitol*.1989; 33: 205-14.
- Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66:2385–2391
- Tavares de Oliveira M, Sulleiro E, Silgado Gimenez A, de Lana M, Zingales B, Santana da Silva J, Marin-Neto JA, Molina I. Quantification of parasite burden of *Trypanosoma cruzi* and identification of Discrete Typing Units (DTUs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(6):e0008311.
- Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(8):e1749.
- Telleria J, Biron DG, Brizard JP, Demettre E, Seveno M, Barnabe C, Ayala FJ, Tibayrenc M. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *U S A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010; 107: 20411–20416.
- Thakare R, Dasgupta A, Chopra S. Update on nifurtimox for treatment of Chagas disease. *Drugs Today (Barc)*. 2021;57(4):251-263.
- Tibayrenc M. Modelling the transmission of *Trypanosoma cruzi*: The need for an integrated genetic epidemiological and population genomics approach. En: *Modelling parasite transmission and control*. Eds. Michael E & Spear RC. 2010. pp. 200-211. Springer-Verlag Berlin, Berlin.

- Tibayrenc, M., Ayala, F.J. Reproductive clonality of pathogens: a perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi, and parasitic protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012; 109: 3305–3313.
- Torhorst CW, White ZS, Bhosale CR, Beatty NL, Wisely SM. Identification of the parasite, *Trypanosoma cruzi*, in multiple tissues of epidemiological significance in the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*): Implications for environmental and vertical transmission routes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022;16(12):e0010974.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31: 472-81.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Genet Evol* 2003; 3: 39-45.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop* 2009; 110: 137-47.
- Veland N, Boggild AK, Valencia C, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Van der Auwera G, Dujardin JC, Arevalo J. *Leishmania (Viannia)* species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: assessment of a molecular stepwise approach. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:495–498.
- Velásquez-Ortiz N, Herrera G, Hernández C, Muñoz M, Ramírez JD. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Sci Data.* 2022;9(1):360.
- Vickerman, K. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London/New York/San Francisco, 1976. pp. 1–34.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006;144(10):724-34.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 574-82.
- Vivas RJ, García JE, Guhl F, Hernández C, Velásquez N, Ramírez JD, Carranza JC, Vallejo GA. Systematic review on the biology, ecology, genetic diversity and parasite

- transmission potential of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811) in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2021;116:e200528.
- Votýpka J, d'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov DA, Lukeš J, Yurchenko V. New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re)description. *Trends Parasitol* 2015; 31:460–469.
- Weiss JB. DNA probes and PCR diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 313-30.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005; 171, 527–543.
- Williams JF. Optimization strategies for the Polymerase Chain Reaction. *Biotechniques* 1989; 7:762-9.
- Wirth M, Gálvez RI, Jochum J, Strauss R, Kristensen K, Stich A, et al. Knowledge, attitudes, behaviors, and serological status related to Chagas disease among Latin American migrants in Germany: A cross-sectional study in six German cities. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;12:1047281.
- World-Health-Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available at: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed April 19, 2023.
- Yamagata Y, Nakagawa J. Control of Chagas disease. *Adv Parasitol*. 2006;61:129-65.
- Yamasaki M, Inokuma H, Sugimoto C, Shaw SE, Aktas M, Yabsley MJ, Yamato O, Maede Y. Comparison and phylogenetic analysis of the heat shock protein 70 gene of *Babesia* parasites from dogs. *Vet Parasitol*. 2007; 145:217–227.
- Yamasaki M, Tajima M, Lee KW, Jeong JR, Yamato O, Maede Y. Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. *Vet Parasitol*. 2002; 11: 123–129.
- Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (Suppl.1):101-7.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(7):1051-4.
- Zingales B, Bartholomeu DC. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117:e210193.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):240-53.

Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 2018; 184: 38–52.

Zulantay I, Muñoz G, Liempi D, Rozas T, Manneschi MJ, Muñoz-San Martín C, Botto-Mahan C, Apt W, Cabrera G. Discrete Typing Units of *Trypanosoma cruzi* Identified by Real-Time PCR in Peripheral Blood and Dejections of *Triatoma infestans* Used in Xenodiagnosis Descriptive Study. *Pathogens.* 2022 Jul 12;11(7):787.