



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
ESCUELA DE POSGRADO

IDENTIFICACIÓN DE LINAJES DE  
*Trypanosoma cruzi* PRESENTES EN  
CHAGAS CONGÉNITO: UN ESTUDIO  
BASADO EN MADRES TRANSMISORAS Y  
NO TRANSMISORAS

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

LENY SANCHEZ JUSTO

LIMA - PERÚ

2018

**Asesora:** PhD Manuela Verastegui Pimentel

**Co-asesor:** PhD Holger Mayta Malpartida

## **DEDICATORIA**

A Dios nuestro señor padre celestial quien me dio la oportunidad de estar aquí para aprender, mejorar y crecer.

A mis padres Arturo y Benigna, quienes siempre están pendientes de mí y me brindaron su apoyo cuando más lo necesitaba.

A mis hermanos y sobrinos quienes son todo en mi vida y fueron mi inspiración para lograr mis objetivos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia quienes me brindan su fuerza y cariño, en cada decisión que tome y por esperarme con tanta vehemencia.

A mis asesores el Dr. Holger Mayta Malpartida y la Dra. Manuela Verastegui Pimentel por su amistad, paciencia, por haber confiado en mí y por su constante apoyo durante el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Robert Gilman, la Dra. Caryn Bern y la Dra. Louisa Messenger, porque me dieron la oportunidad de realizar los estudios de maestría y la ejecución de mi tesis.

Al grupo de trabajo en Chagas de Perú y Bolivia, por el apoyo brindado en la ejecución del presente trabajo.

**Este trabajo de tesis fue parcialmente financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) convenio N° 119-2015-FONDECYT.**

## ÍNDICE

I.	Introducción .....	1
II.	Planteamiento de la Investigación .....	4
2.1	Planteamiento del Problema .....	4
2.2	Marco Teórico .....	5
2.3	Justificación del estudio.....	22
2.4	Objetivos .....	24
III.	Metodología .....	25
3.1	Diseño del estudio .....	25
3.2	Población de estudio .....	25
3.3	Muestra .....	26
3.4	Procedimientos y Técnicas .....	28
3.5	Consideraciones éticas .....	39
3.7	Plan de análisis.....	39
IV.	Resultados .....	40
V.	Discusión .....	57
VI.	Conclusiones.....	61
VII.	Recomendaciones.....	62
VII.	Referencias bibliográficas.....	63
VIII.	Anexos.....	70

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estadios de desarrollo de <i>T. cruzi</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Ciclo biológico de la enfermedad de Chagas.....	9
<b>Figura 3.</b> Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en América latina. .....	13
<b>Figura 4.</b> Distribución de los casos de infección por <i>T. cruzi</i> .....	14
<b>Figura 5.</b> Dos mayores modelos originales de los híbridos DTUs.....	18
<b>Figura 6.</b> Distribución de los subgrupos TcI-TcVI de <i>T. cruzi</i> en las Américas ..	20
<b>Figura 7.</b> Obtención de muestras del recién nacido.....	27
<b>Figura 8.</b> Esquema de sensibilización de la placa de ELISA.....	36
<b>Figura 9.</b> Procedimiento de la técnica de serotipificación.....	38
<b>Figura 10.</b> Distribución de la carga parasitaria de <i>T. cruzi</i> en muestras de sangre y tejido de cordón umbilical de madres y sus recién nacidos.....	42
<b>Figura 11.</b> Amplificación por PCR-RFLP para determinación del límite de Identificación de linaje de <i>T. cruzi</i> .....	44
<b>Figura 12.</b> Amplificación por PCR-RFLP de los marcadores COXII+AluI, ADNr 24 $\alpha$ y Mini-exon SL-IRAac Identificación de linaje de <i>T. cruzi</i> .....	47
<b>Figura 13.</b> Amplificación por PCR-RFLP del marcador molecular COXII.....	49
<b>Figura 14.</b> PCR-RFLP del marcador molecular COXII+AluI.....	50
<b>Figura 15.</b> Amplificación por PCR del marcador molecular ADNr 24 $\alpha$ .....	51
<b>Figura 16.</b> Amplificación por PCR del marcador molecular Mini-exon SL-IRAac. .....	52

<b>Figura 17.</b> Dendograma generado por los softwares D-UPGMA y The Newick Format.....	54
<b>Figura 18.</b> El reconocimiento de los péptidos específicos del linaje TSSA (Antígeno pequeño de Superficie de Tripanosoma).....	56



## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Nomenclaturas de las divisiones de <i>T. cruzi</i> .....	17
<b>Tabla 2.</b> Detalle de los primers y condiciones de ciclamiento de la región o gen interés para PCR-RFLP.....	33
<b>Tabla 3.</b> Perfil de amplificación de marcadores utilizados para identificación de los linajes de <i>T. cruzi</i> .....	34

## RESUMEN

La transmisión congénita es una de las vías importantes para la infección con el protozoario *Trypanosoma cruzi*. En Bolivia la proporción de casos de transmisión congénita es de 6.5-11.7%, desconociéndose los factores involucrados en este tipo de transmisión. La severidad de la enfermedad de Chagas está asociada a los linajes descritos en *T. cruzi*, los cuales también podrían estar asociados a la transmisión congénita. El objetivo del presente trabajo fue identificar los linajes de *T. cruzi* presentes en recién nacidos y en madres transmisoras y no transmisoras de la enfermedad de Chagas de Santa Cruz-Bolivia. La presencia y cuantificación de *T. cruzi* en sangre y tejido de cordón umbilical se determinó mediante qPCR. Las muestras de recién nacidos fueron genotipificadas mediante PCR-RFLP, mientras que las muestras de madres fueron serotipificadas mediante la técnica ELISA.

El tejido de cordón umbilical presentó mayor carga parasitaria ( $5.0 \times 10^8$  par-eq/mg), en comparación a la sangre del cordón umbilical ( $8.5 \times 10^5$  par-eq/ml); por otro lado, la carga parasitaria de la madre ( $1.8 \times 10^3$  par-eq/ml) fue menor que la carga parasitaria de su recién nacido. El DTU TcV fue el único detectado en todos los recién nacidos transmitidos congénitamente. El análisis serológico mostró que el 50% de madres transmisoras y el 38.2% madres no transmisoras reconocieron al epítipo TSSA común a los linajes TcII/TcV/TcVI (TSSA<sub>pep-II/V/VI</sub>).

**Palabras claves:** Transmisión congénita, *T. cruzi*, Enfermedad de Chagas, DTUs, PCR-RFLP, ELISA.

## ABSTRACT

Congenital transmission is an important route for *Trypanosoma cruzi* transmission. In Bolivia, congenital transmission varies from 6.5 to 11.7% among infected mothers, and the factors that may be involved in congenital transmission are unknown. Severity of Chagas disease has been associated to the lineages described in *T. cruzi*, which could also be associated to congenital transmission. The objective of this study was to identify *T. cruzi* lineages present during congenital transmission testing newborns, and transmitters and non-transmitter mothers in Santa Cruz, Bolivia. The presence and quantification of *T. cruzi* in blood and umbilical cord tissue was previously determined by qPCR. The samples from newborns were genotyped by PCR-RFLP, while the samples from mothers were serotyped using the ELISA technique. Umbilical cord tissue presented a higher parasitic load ( $5.0 \times 10^8$  par-eq/mg), compared to umbilical cord blood ( $8.5 \times 10^5$  par-eq/ml). Parasitic load of the mother ( $1.8 \times 10^3$  pair-eq/ml) was lower than the parasitic load of their new-born. The TcV DTU was the only DTU detected in all congenitally transmitted newborns. The serological analysis of transmitting mothers showed that 50% of sera recognized the TSSA epitope common to the TcII / TcV / TcVI lineages (TSSA<sub>pep-II / V / VI</sub>); while in non-transmitting mothers 38.2% of sera recognized the TSSA epitope common to the TcII / TcV / TcVI lineages (TSSA<sub>pep-II / V / VI</sub>).

Keywords:

Congenital transmission, *T. cruzi*, Chagas disease, DTUs, PCR-RFLP, ELISA.

## I. INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, enfermedad catalogada como uno de los principales problemas de salud pública en América Latina. Se estima que 8 millones de personas padecen la enfermedad y alrededor de 100 millones están en riesgo de contraerla (Caryn Bern, 2009; Organización Panamericana de la Salud, 2006). *T. cruzi* es un parásito protozoario flagelado que se transmite principalmente a través de las heces de insectos triatomíneos. Sin embargo, la enfermedad se transmite a través de otras vías de transmisión como la oral, transfusión sanguínea, trasplante de órganos y la transmisión congénita (Materno-Fetal) (Rassi, & Marin-Neto, 2010).

Una de las vías de transmisión poco estudiada es la congénita que constituye una de las vías más importantes de infección por *T. cruzi*, debido a que no requiere del insecto vector y por tanto ocurre en regiones endémicas como no endémicas para la enfermedad. La transmisión congénita se produce en un 6.5 al 11.7% entre las madres infectadas, observándose una variabilidad en la presentación clínica en los niños con Chagas congénito que va desde asintomática hasta las formas graves y mortales de la enfermedad (Bern, 2009; Messenger et al., 2017; Rendell et al., 2015; Torrico et al., 2004).

En la infección humana se reconocen dos fases: la fase aguda, que dura pocas semanas o meses (cuando los parásitos se encuentran en el torrente sanguíneo), y la fase crónica, que se produce cuando el parásito pasa a los tejidos principalmente del corazón, esófago y otros (Organización Mundial de la Salud, 2013). Durante la fase aguda de la enfermedad, el diagnóstico se basa en métodos parasitológicos y moleculares; sin embargo, en la fase crónica, tales herramientas

tienen una sensibilidad baja, que varía entre el 50 y 65%, debido a los bajos niveles de parasitemia (Avila et al., 1993; Chiari et al., 1989). La fase crónica se caracteriza también por una respuesta inmune humoral fuerte y persistente; por lo tanto, la medición de anticuerpos IgG específicos para antígenos del parásito son de gran ayuda para el diagnóstico (Zingales et al., 2009).

En la actualidad *T. cruzi* se divide en seis linajes genéticos denominados Unidades Discretas de Tipificación (DTU) TcI-TcVI los cuales tienen distribución geográfica y ecología dispersa en América Latina. Los DTUs TcI, TcII, TcV y TcVI están más relacionados con las enfermedades humanas, en comparación con los DTUs TcIII y TcIV que tienen distribución silvestre (Zingales et al., 2012). Los DTUs TcII y TcV han sido reportados en la enfermedad de Chagas congénito en Chile (García et al., 2014), asimismo el DTU TcV fue reportado en Bolivia (Sucre, Potosí, Cochabamba y Tarija) y Argentina (Santiago de Estero, Chaco, Córdoba y Santa Fé) (Burgos et al., 2007; Virreira et al., 2007).

La identificación de linajes genéticos de *T. cruzi* mediante genotipificación en muestras de pacientes en fase crónica se dificulta debido a la baja carga parasitaria. Dentro de este contexto, un método de tipificación del parásito basado en la detección de anticuerpos específicos a partir de sueros de pacientes en fase crónica podría resolver muchos de estos problemas. En la actualidad hay pocos estudios que proponen el uso de un antígeno para discriminar los linajes de *T. cruzi*. La proteína TSSA (Trypomastigote Small Surface Antígeno o Antígeno menor/pequeño de la Superficie de Tripomastigote) es una proteína que pertenece a la familia de las proteínas TMUCII, que presenta diferencia en relación a los linajes genéticos de *T. cruzi*, y ha sido propuesta como candidata para la

identificación de linajes genéticos a partir de sueros de pacientes en fase crónica (Buscaglia et al., 2006). Posterior a este descubrimiento se clasificó 5 epítomos comunes a los linajes TcI, TcII/TcV/TcVI, TcIII, TcIV y TcV/VI. Estos epítomos fueron sintetizados (péptidos) y denominados, TSSApep-I, TSSApep-II/V/VI, TSSApep-III, TSSApep-IV y TSSApep-V/VI (Bhattacharyya et al., 2010). Los linajes TSSApep TcII/TcV/TcVI han sido reportados en pacientes crónicos de Brasil, Bolivia y Argentina. (Bhattacharyya et al., 2014).

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar los linajes de *T. cruzi* presentes en madres transmisoras y no transmisoras de la población de Santa Cruz Bolivia mediante qPCR, PCR-RFLP y serotipificación mediante la técnica de ELISA.

## II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.1 Planteamiento del problema.

La transmisión congénita de Chagas constituye un desafío para el control de la enfermedad de Chagas. La migración de individuos, en especial de mujeres en edad fértil, con infección crónica asintomática de zonas endémicas a zonas no endémicas ha generado la globalización de la enfermedad (Schmunis, 2007). En América Latina alrededor de 1.8 millones de mujeres en edad fértil están infectadas con *T. cruzi* (Organización Panamericana de la Salud, 2006). Anualmente, alrededor de 14400 recién nacidos en América Latina (Organización Panamericana de la Salud, 2006) y 2000 en América del Norte (Buekens et al., 2008) están infectados congénitamente. Las consecuencias de la transmisión congénita de Chagas son diversas puede causar daño (parto prematuro, bajo peso del recién nacido, hidrocefalia, hasta la muerte del feto) o no causar daño (Torricco et al., 2006). Poco se conoce sobre los mecanismos de transmisión congénita, algunos mecanismos involucrarían la respuesta inmune materna, factores placentarios o a las características de los linajes genéticos de *T. cruzi* (Virreira et al., 2006). Se ha sugerido que la transmisión congénita está relacionada con el genotipo del parásito; así de los seis linajes genéticos (denominados DTUs TcI-TcVI), los DTUs TcII y TcV fueron reportados en transmisión congénita en Chile (García et al., 2014), y el DTU TcV fue reportado en Argentina y Bolivia (Burgos et al., 2007; Virreira et al., 2007). Una de las mayores limitantes de este tipo de estudios es la tipificación de las cepas presentes en las madres, debido principalmente a la baja carga parasitaria que puede incluso dar resultados negativos en la prueba de detección mediante qPCR. Una alternativa a la

genotipificación es la serotipificación recientemente descrita, que se basa en la detección de anticuerpos específicos contra péptidos sintéticos derivados de la proteína TSSA (Bhattacharyya et al., 2010; Buscaglia et al., 2006), en pacientes con la enfermedad de Chagas en fase crónica (Bhattacharyya et al., 2014).

El presente estudio propone el uso de la serotipificación basada en estos péptidos a fin de identificar los linajes de *T. cruzi* en muestras de madres transmisoras y no transmisoras y la genotipificación en muestras de cordón umbilical de recién nacidos como una aproximación a entender la influencia del linaje de *T. cruzi* en la transmisión congénita.

## **2.2 Marco teórico**

### **2.2.1 Vectores transmisores de la enfermedad de Chagas**

En la actualidad se ha reportado alrededor de 140 especies de triatomíneos, que en su mayoría son vectores relacionados con la transmisión de *T. cruzi*. Estos vectores se encuentran distribuidos en América Latina, dentro de ellos *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongilus megistus* y *Triatoma dimidiata* son catalogados como los vectores más frecuentes porque tienen características marcadas de adaptación (Schofield & Galvão, 2009).

### **2.2.2 Agente etiológico**

El agente causal de la enfermedad de Chagas es *Trypanosoma cruzi*. Este parásito presenta tres formas morfológicas principales las cuales son: Amastigote, epimastigote y tripomastigote (García et al., 2010). Estas formas morfológicas del



agente se clasifican en dos estadios, replicativo no infectivo e infectivo no replicativo (Bern, 2011) (Figura 1).

**Estadio replicativo no infectivo:**

**a. Amastigote:** Miden entre 2-4 $\mu$ m, presentan una forma esférica u ovalada no móvil (carecen de flagelo), el kinetoplasto se encuentra en la parte anterior cerca al núcleo y su división se da por fisión binaria. Es el estadio de localización intracelular y se replica en la célula del mamífero (Huésped vertebrado) formando pseudoquistes o nidos de amastigotes. (Kirchoff , 2000).

**b. Epimastigote:** Miden entre 20-40 x 2 $\mu$ m, presenta una forma fusiforme o elongada, el kinetoplasto se encuentra localizado centralmente anterior al núcleo, el flagelo surge de la mitad del parásito, que se encuentra delante del núcleo, que se encuentra en la membrana citoplasmática, dando la imagen de una membrana ondulante corta y liberándose por el extremo anterior. El parásito en esta fase se reproduce por fisión binaria y se desarrolla en el vector (insecto), pasando desde el intestino medio hasta el intestino posterior del vector.

**Estadio infectivo no replicativo:**

**c. Tripomastigote metacíclico:** Mide entre 20-25 $\mu$ m, es la forma diferenciada de los epimastigotes, se encuentran en la porción distal del intestino del vector, tiene forma alargada, con un flagelo más largo que los

epimastigotes, la membrana ondulante se observa a lo largo del cuerpo del parásito y surge libremente en el extremo posterior. Posee un núcleo grande y central, su kinetoplasto es de gran tamaño y de forma esférica, ubicada por detrás del núcleo. En esta fase el parásito se deposita en las heces del insecto para así penetrar por la mucosa o por solución de continuidad de la piel en el huésped e infectar las células (De Souza, 2002).

**d. Tripomastigote sanguíneo** Morfológicamente se parece al estadio de tripomastigote metacíclico, pero se diferencia a nivel de expresión de proteínas. Este estadio se encuentra presente en la circulación sanguínea del huésped donde puede infectar células nuevas o pasar al vector invertebrado y cerrar el ciclo de vida del parásito (De Souza, 2002; Katzin et al., 1983).

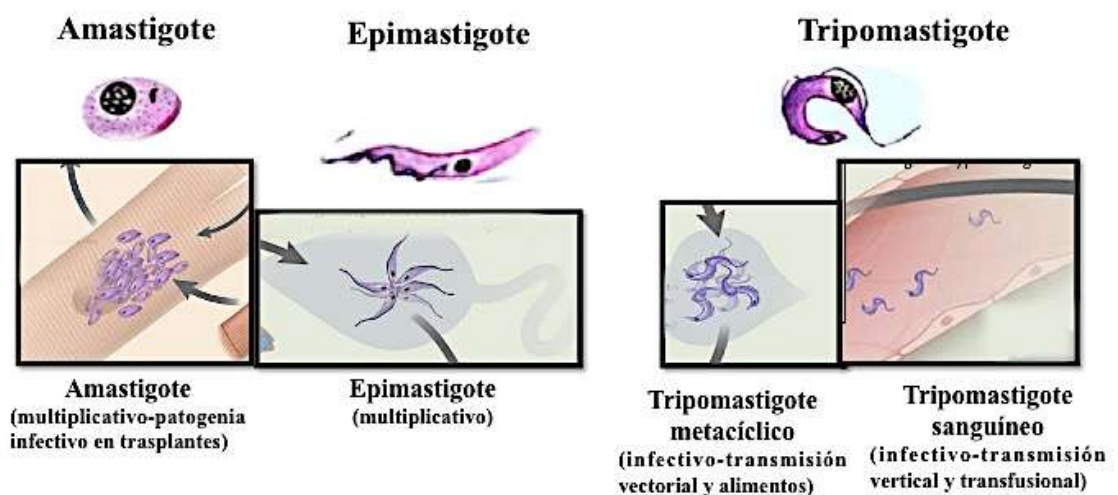


Figura 1. Estadios de desarrollo de *T. cruzi*. Modificado de Bern, 2011.

### **2.2.3 Ciclo biológico**

El ciclo inicia cuando el vector ingiere sangre del mamífero infectado con tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigote ingeridos se transforman en epimastigotes y se replican en el intestino medio del vector. Los epimastigotes luego migran en dirección al intestino posterior y se transforman en tripomastigotes metacíclicos infecciosos, que se excretan con las heces del vector en el momento de ingerir la sangre del huésped. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan a través de una herida, o a través de la zona de picadura o una membrana mucosa intacta del huésped mamífero e invaden diferentes tipos de células nucleadas. En el citoplasma, los tripomastigotes se transforman en amastigote intracelular y se replica con un tiempo de aproximadamente 12 horas, durante un período de 4 a 5 días. Finalizando este período, los amastigotes se transforman en tripomastigotes, rompiendo las células del hospedero y liberándose en la circulación. Estos parásitos circulantes pueden invadir nuevas células e iniciar nuevos ciclos de replicación y están disponibles para infectar nuevamente vectores que se alimenten de estos huéspedes (Bern, 2011) (Figura 2).

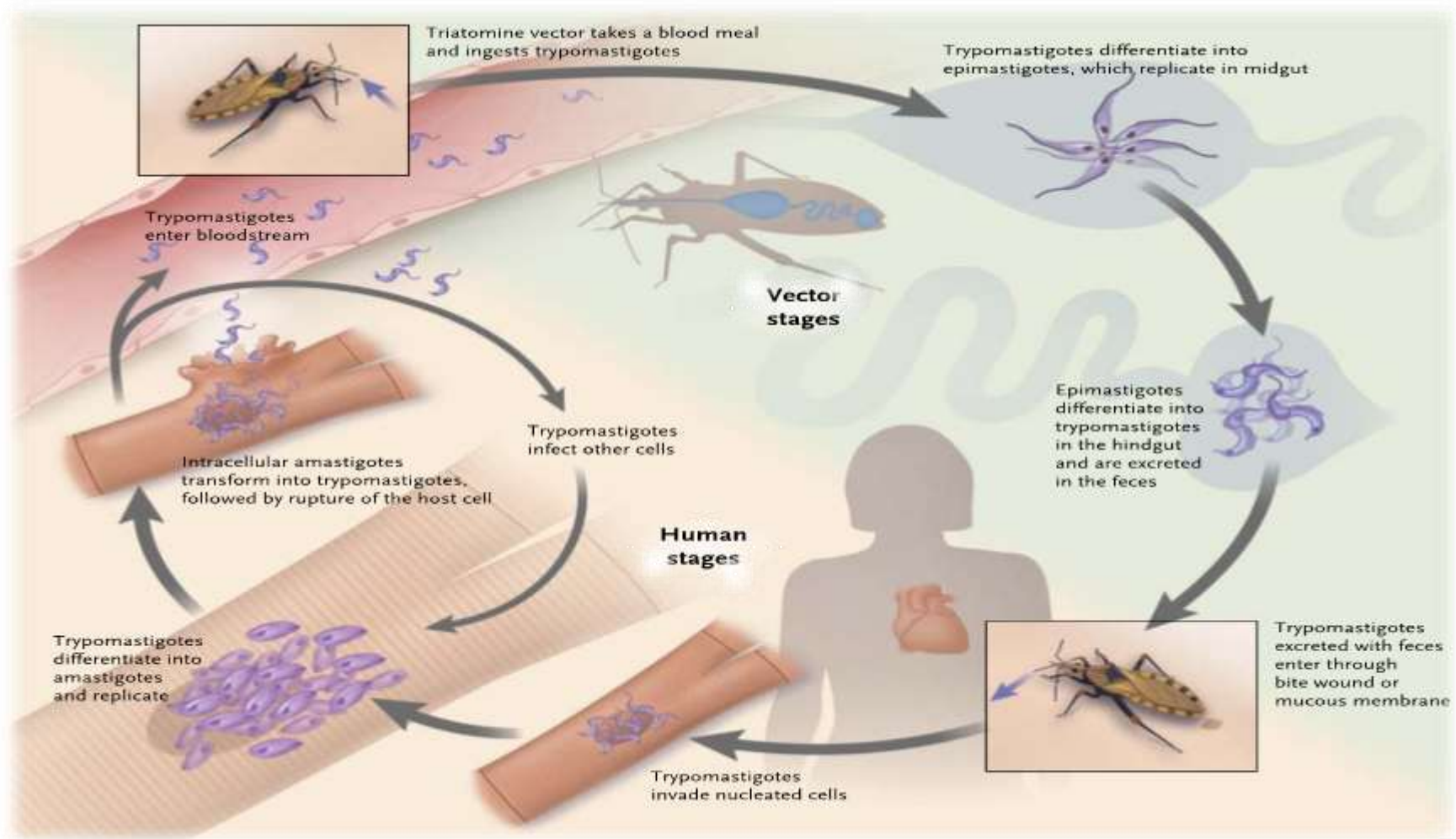


Figura 2. Ciclo biológico de la enfermedad de Chagas. Fuente: Bern C., 2011.

#### 2.2.4 Transmisión de la Enfermedad de Chagas

Una de las principales fuentes de infección de *T. cruzi* es la transmisión vectorial, otras formas de transmisión se da por medio de transfusiones de sangre, por trasplante de órganos, por vía transplacentaria (congénita), por vía oral y por accidentes de laboratorio (Organización Mundial de la Salud, 2013).

**a. Transmisión Vectorial:** La transmisión de *T. cruzi* desde el vector hacia los humanos y otros mamíferos es a través de las heces del triatomino infectado. La transmisión vectorial se presenta en tres ciclos:

1) El doméstico, consiste cuando el vector infecta de forma exclusiva las viviendas humanas en áreas rurales y suburbanas, colonizando casas de pobre calidad;

2) El peri-doméstico, consiste cuando el vector se mantiene alrededor del núcleo de las poblaciones humanas y

3) El enzoonótico, consiste cuando el vector se mantiene alejado del núcleo de las poblaciones humanas y tiene una participación exclusiva con reservorios silvestres (Pinto-Días, 1990).

**b. Transmisión por transfusión sanguínea:** Es el segundo mecanismo de transmisión más importante, se da por la transfusión de sangre que proviene de donadores con la enfermedad de Chagas asintomáticos, causando cuadros clínicos agudos a los receptores. Existen también factores relacionados al parásito, al individuo receptor, al número de transfusiones recibidas y la prevalencia de infección en el área estudiada,

que pueden estar asociados con el riesgo de adquirir *T. cruzi* (Organización Mundial de la Salud, 1991).

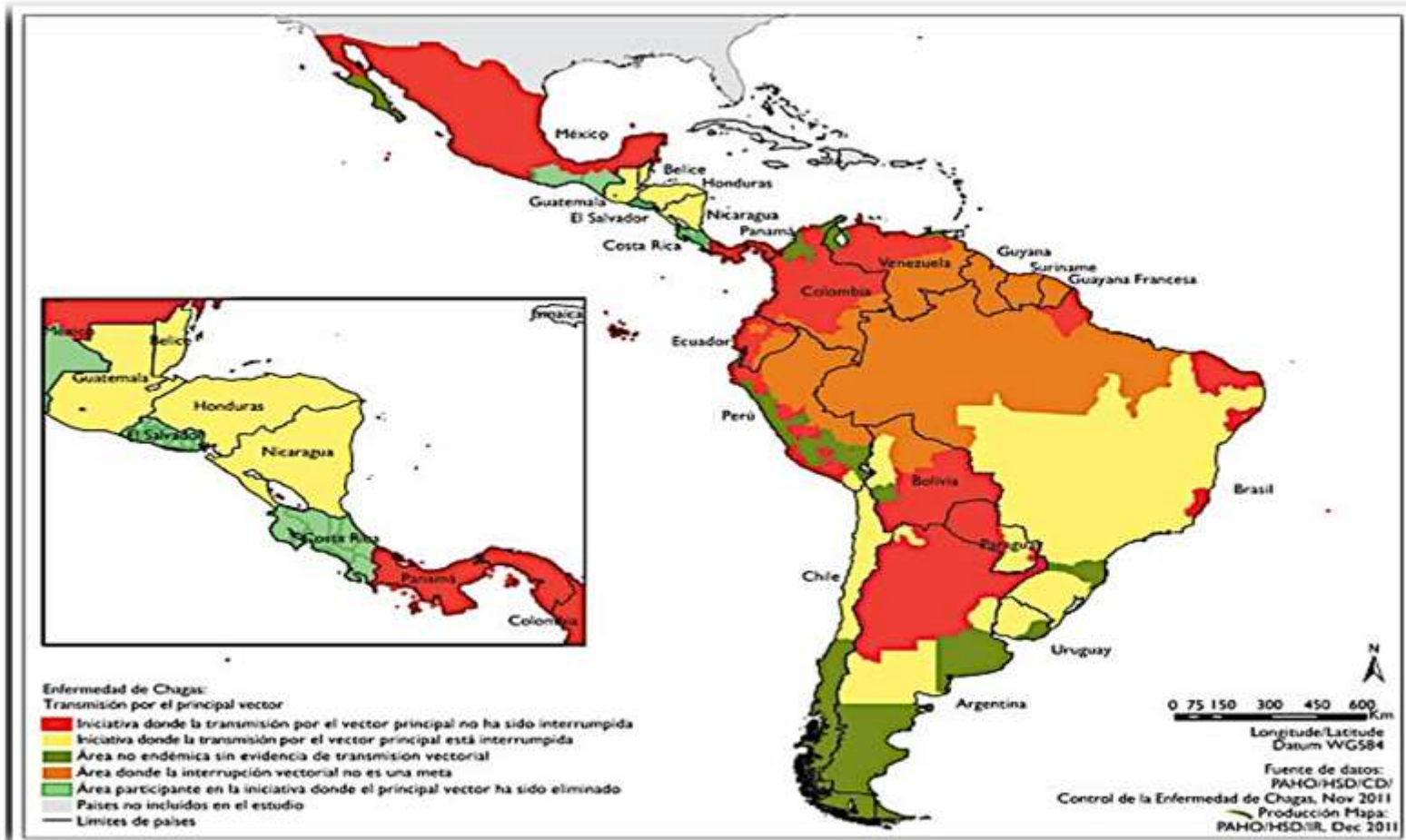
- c. Transmisión por trasplante de órganos:** Esta vía de transmisión ha adquirido relevancia debido al aumento del número de trasplantes renales, hepáticos, cardíacos y de medula ósea o sangre de cordón. Los pacientes que han recibido órganos de donadores con la enfermedad crónica desarrollan episodios agudos de la enfermedad y el parásito se puede aislar de sangre periférica. Además, como los individuos receptores están bajo terapia inmunosupresora, la susceptibilidad a la infección puede aumentar considerablemente (Wendel et al., 1992).
- d. Transmisión congénita:** Se produce en humanos, cuando la madre gestante puede transmitir la enfermedad a todos o a algunos de sus descendientes. Estos casos pueden ocurrir en las dos fases de la enfermedad aguda y crónica (Wendel et al., 1992). La infección parece no afectar la fertilidad ni tampoco el curso del embarazo y puede ocurrir en los subsecuentes embarazos de la misma madre.
- e. Transmisión Oral:** La transmisión oral generalmente ocurre por la ingesta de alimentos contaminados con las heces de los triatominos infectados con *T. cruzi*. Estos casos se presentan en lugares de condiciones precarias e insalubres, permitiendo tener contacto directo del vector con el huésped humano. (Maldonado, 2009). Esta transmisión se produce porque

el parásito tiene la capacidad de penetrar y evadir la barrera protectora de la mucosa gástrica (Camandaroba, Pinheiro Lima, & Andrade, 2002)

- f. Transmisión por accidente de laboratorio:** La transmisión por accidente de laboratorio generalmente ocurre por un manejo inadecuado de material biológico, instrumentos o animales de experimentación (Pinto-Días & Rodriguez-Coura, 1997).

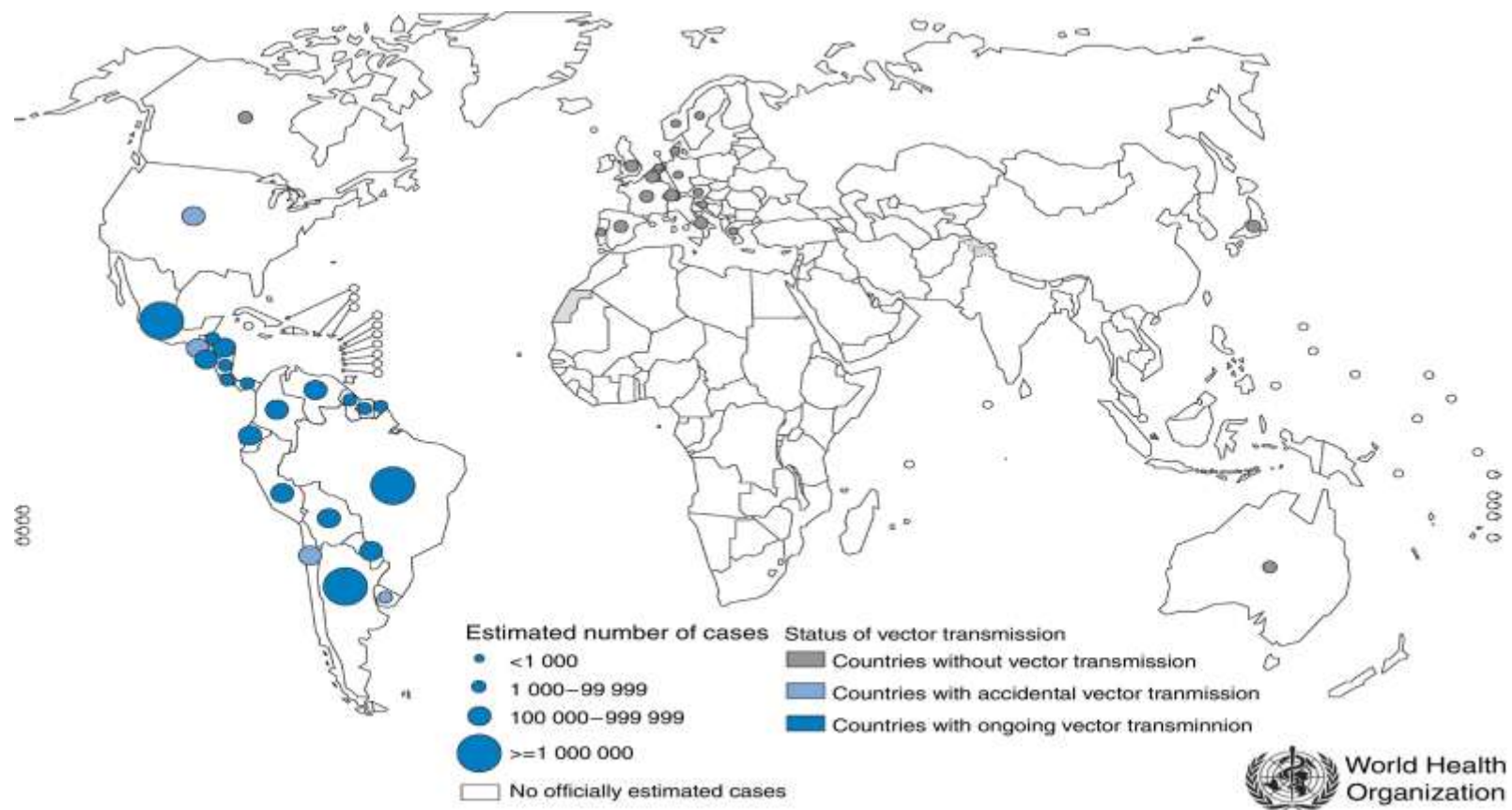
### **2.2.5 Epidemiología de la enfermedad de Chagas.**

Se estima que la enfermedad de Chagas afecta entre 8 a 10 millones de personas a nivel mundial y que alrededor de 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad (Organización Mundial de la Salud, 2013). De cada 500 000 personas infectadas, 300 000 son niños, con tasas de mortalidad del 10 al 15% en la fase inicial de la enfermedad (Organización Panamericana de la Salud, 2004). La enfermedad de Chagas se encuentra distribuida principalmente en zonas endémicas de 21 países de América Latina (Organización Mundial de Salud, 2017) (Figura 3). En las últimas décadas, la enfermedad de Chagas se reporta con mayor frecuencia, en países no endémicos como los de la región de América del Norte (EE. UU. y Canadá), la región Europea y Occidental (Australia y Japón). La presencia de la enfermedad fuera de América Latina se debe a la constante migración de la población de zonas endémicas a zonas no endémicas (Figura 4) (Organización Mundial de Salud, 2017).



**Figura 3. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en América latina.** Fuente: Creado a partir de los datos informado al Área de Vigilancia Sanitaria y Control de enfermedades de la Organización Panamericana de Salud (PAHO) 2011.





**Figura 4. Distribución de casos de infección de *T. cruzi*.** Mapa basado en estimaciones oficiales y estado de la transmisión vectorial, 2006-2009. Fuente: World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases 2010.

### **2.2.6 Enfermedad de Chagas en Bolivia.**

En Bolivia la enfermedad de Chagas es un problema de salud pública. Se estima que aproximadamente el 60% del territorio que va entre los 300 a 3500m.s.n.m. posee áreas con dispersión de vectores, involucrando siete de nueve departamentos. Los porcentajes de positividad en los 7 departamentos endémicos tienen un promedio de 28% y se distribuyen en Santa Cruz 51%, Tarija 45%, Cochabamba 28%, Sucre 39%, la Paz 4.9%, Oruro 6% y Potosí 24%. Presentando una población en riesgo de 3'700 000 habitantes, de las que 1'800 000 estarían infectados (Gaceta Medica Boliviana, 2011).

Actualmente, la implementación de los programas de control de la enfermedad de Chagas por la OMS ha permitido el control e interrupción de la transmisión vectorial del *T. cruzi* (Moncayo & Silveira, 2009), aunque en zonas urbanas se mantiene la enfermedad debido a la transmisión no vectorial, siendo la transmisión congénita la de mayor importancia (Moya, Basso, & Moretti, 2010).

Finalizando el 2010, en Bolivia se realizó un estudio de tamizaje, analizando a 431 218 mujeres embarazadas, de las cuales 98 037 resultaron positivas. De este grupo de madres se analizaron a sus niños nacidos un total de 83 278, resultando 1389 casos de transmisión congénita. La mayoría de los casos fueron diagnosticados durante el nacimiento (55%) y el resto fue diagnosticado posterior al nacimiento (22% antes de los 6 meses de vida y 23% entre 6 y 12 meses). (Ministerio de Salud y Deportes Bolivia, 2011).

### **2.2.7 Variabilidad genética de *T. cruzi***

Se sabe que las cepas de *T. cruzi* presentan una diversidad biológica, bioquímica, genética y una complejidad ecoepidemiológica. Estas características fueron ampliamente revisadas en distintos lugares (Campbell, Westenberger, & Sturm, 2004; Macedo & Pena, 1998; Miles et al., 2009). Conforme pasaron los años muchos investigadores utilizaban diversos enfoques, para caracterizar la estructura de la población de *T. cruzi*, y definir el número de subgrupos. A raíz de ellos, los sub grupos recibieron diferentes designaciones, como Zimodemos (Miles et al., 1981; Miles & Cibulskis, 1986; Romanha, Chiari, & Kilgour, 1979), Esquizodemos (Morel et al., 1980), Biodemos (Andrade & Magalhaes, 1996), Clones (Tibayrenc & Ayala, 1991), Linajes (Souto et al., 1996), Clados (Kawashita et al., 2001) y, más recientemente, Unidades Discretas de Tipificación (DTU – Discrete Typing Units) (Tibayrenc, 1998) y Haplotipos (De Freitas et al., 2006; Herrera et al., 2007).

La comunidad científica involucrada en la filogenia de *T. cruzi*, ha dado a conocer la presencia de seis DTUs y dos subdivisiones principales. Estas subdivisiones fueron denominadas DTU I y DTU II (Tibayrenc, 1998). Indicando que el DTU II se divide en cinco DTUs (DTU Ila, I Ib, I Ic, I Id y I Ie) (Brisse, Verhoef, & Tibayrenc, 2001). Finalmente *T. cruzi* fue clasificado en seis subgrupos denominados Tc I-VI (Zingales et al., 2009; Zingales et al., 2012) (Tabla 1).

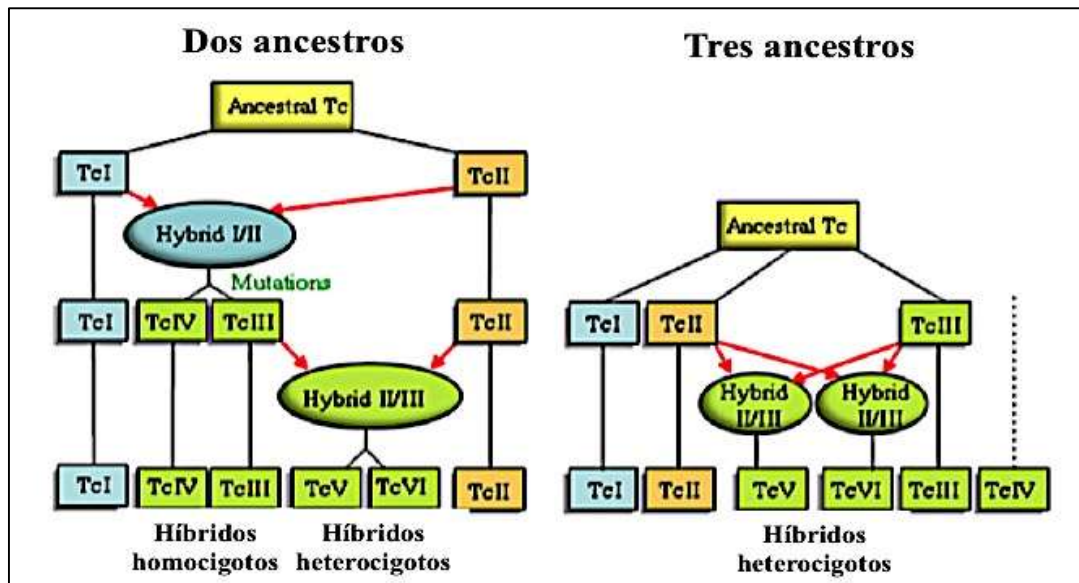
**Tabla 1. Nomenclaturas de las divisiones de *T. cruzi***

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
DTU I	DTU 1	1-25	Z I	X10 cl1, Cuica cl 1
DTU II	DTU 2a	26-29	Z II	CAN III cl 1
DTU III	DTU 2b	30-34	Z III	TU 18 cl2
DTU IV	DTU 2c	35-37	Z IV	M5631, M6241
DTU V	DTU 2e	38, 39	Z V	MN cl2, SC43 cl1
DTU VI	DTU 2f	40, 43	Z VI	CL Brenner, Tulahuen cl2

Las clasificaciones se basan en lo descrito por 1= Zingales et al. (2009); 2= Brisse et al. (2000a); 3= Tibayrenc et al. (1986); 4= Miles et al. (1977); 5= Cepas de representativas de stocks. Retirado de Talleria J. & Tibayrenc M. 2010.

En la actualidad se ha propuesto dos modelos para dar origen a los Linajes híbridos de *T. cruzi*, las cuales se agrupan en dos eventos de hibridación, denominados:

- 1) Modelo de “Dos ancestros” (Westenberger et al., 2005), propone que los linajes TcI y TcII dan origen a TcIII y TcIV en un evento de hibridación ancestral, seguida por una nueva hibridación reciente entre TcII y TcIII para generar TcV y TcVI.
- 2) Modelo de “Tres ancestros” (De Freitas et al., 2006), propone que el TcIII es un linaje ancestral, y que los dos eventos de recombinación fueron recientes, entre los grupos TcII y TcIII, dando origen a TcV y TcVI (Zingales et al., 2012) (Figura 5).



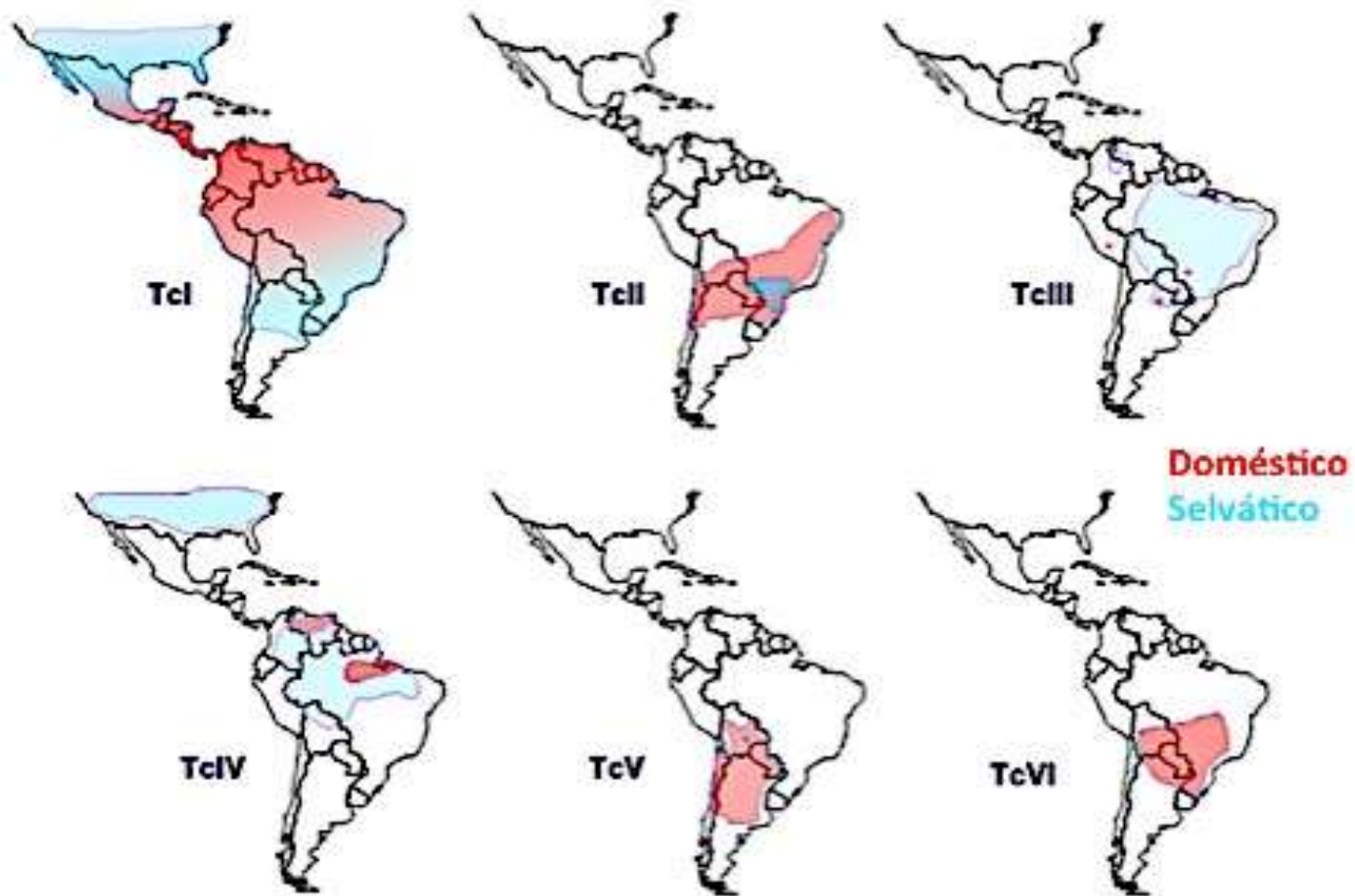
**Figura 5. Dos mayores modelos originarios de los híbridos DTUs.**  
Fuente: modificado de Zingales et al., 2012.

Los subgrupos de *T. cruzi* se distribuyen según su preferencia por el vector y hospedero vertebrado (Figura 6). El DTU TcI es el agente predominante de la enfermedad de Chagas, se encuentra presente en la región Amazónica y en países del norte de Amazonas: Venezuela, Colombia y Perú (Miles et al., 2009). En el Brasil el DTU TcI está más relacionado al ciclo silvestre a diferencia de otros países que mencionan que tiene ciclo doméstico o peri-doméstico (Miles et al., 2009; Vargas, Pedroso, & Zingales, 2004; Zingales et al., 2012). El DTU TcI está relacionado más a daños al tejido cardiaco (Miles et al., 2009).

El DTU TcII es el más prevalente en Brasil, siendo responsable por los daños agudos, cardíacos y digestivos crónicos. El DTU TcII está más relacionado al ciclo doméstico y peri-doméstico (Miles et al., 2009; Zingales et al., 2012).

Los DTUs TcIII y TcIV están más relacionados al ciclo silvestre. El DTU TcIII se distribuye desde el Norte de América del Sur hasta Argentina y Venezuela. La distribución del DTU TcIV es poco comprendida, relacionándolo con el DTU TcIII (Miles et al., 2009; Zingales et al., 2012).

Los DTUs TcV y TcVI están relacionados con la mayoría de las afecciones de Chagas aguda grave. Estos dos subgrupos se distribuyen en Bolivia, Chile, Paraguay, Norte de Argentina y Sur del Brasil (Miles et al., 2009; Zingales et al., 2012).



**Figura 6. Distribución de los subgrupos TcI-TcVI de *T. cruzi* en las Américas.** Las regiones rojas corresponden al ciclo doméstico, mientras que las regiones azules corresponden al ciclo salvaje del parásito. Retirado de Zingales et al., 2012).

### 2.2.8 Variedad serotípica de *T. cruzi*

La variedad serotípica, se basa en la detección de anticuerpos específicos de epítomos específicos de las diferentes cepas de *T. cruzi*, a partir de sueros de pacientes en fase crónica. La proteína TSSA (Trypomastigote Small Surface Antígeno o Antígeno menor/pequeño de la Superficie de Tripomastigote) es una proteína que pertenece a la familia de las proteínas TMUCII, que presenta una región variable en relación a los linajes genéticos de *T. cruzi*, proponiéndola como candidata para la identificación de linajes genéticos a partir de sueros de pacientes en fase crónica (Buscaglia et al., 2006). La proteína TSSA fue clasificada en 5 epítomos comunes a los linajes TcI, TcII/TcV/TcVI, TcIII, TcIV y TcV/VI, los cuales fueron sintetizados (péptidos) denominados, TSSApep-I, TSSApep-II/V/VI, TSSApep-III, TSSApep-IV y TSSApep-V/VI (Bhattacharyya et al., 2010). Estos péptidos son marcadores serológicos que permiten discriminar los linajes de *T. cruzi* en suero de pacientes crónicos. En un estudio realizado en Brasil, Bolivia y Argentina, reportaron la presencia del TSSApep TcII/TcV/TcVI en pacientes Chagásicos en fase crónica (Bhattacharyya et al., 2014).



### 2.3 Justificación del estudio

La transmisión congénita es uno de los principales problemas de la enfermedad de Chagas (Carlier & Truyens, 2015; Torrico et al., 2004) tanto en países endémicos como no endémicos. En países endémicos este tipo de transmisión prevalece por la inmigración de mujeres portadoras asintomáticas (Bern, Martin, & Gilman, 2011). Además, las mujeres infectadas con *T. cruzi*, transmitirán el parásito de generación en generación (Carlier et al., 2015).

Aunque la transmisión congénita ha sido correlacionada con la carga parasitaria (Messenger et al., 2017; Rendell et al., 2015), existen algunas madres con alta carga parasitaria que no transmiten la enfermedad y contrariamente mujeres con carga parasitaria nula (qPCR negativo) que sí transmiten la enfermedad (Virreira et al., 2007). Se postula que algunos linajes de *T. cruzi* están asociados a transmisión congénita (Burgos et al., 2007; Garcia et al., 2014; Virreira et al., 2007).

Recientemente, se ha desarrollado una prueba de ELISA basada en la detección de anticuerpos específicos contra péptidos sintéticos derivados de la proteína de membrana TSSA (Bhattacharyya et al., 2014) para la serotipificación de *T. cruzi* y que parece correlacionar con los linajes genéticos de *T. cruzi* en individuos con enfermedad de Chagas en fase crónica. Sin embargo, aún no existen estudios en los que se emplee esta metodología para la serotipificación de madres con Chagas en fase crónica. La aplicación de la serotipificación para la identificación de linajes de *T. cruzi* asociados a transmisión congénita sería de gran utilidad, ya que nos permitiría inferir el tipo de o tipos de linajes genéticos presentes en aquellas madres transmisoras y no transmisoras de la enfermedad. Debido a que esta

técnica no requiere ni depende de altos niveles de parasitemia se superaría una de los principales obstáculos en la determinación del linaje de *T. cruzi* genético (genotipificación) como es la baja carga parasitaria observada en madres con Chagas crónico. La identificación de los linajes genéticos más prevalentes en transmisión congénita, no solo ayudaría a una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad, si no también sería de utilidad para diseñar programas dirigidos a un mejor manejo de las madres transmisoras y sus recién nacidos.

## **2.4 Objetivos**

### **2.4.1 Objetivo General**

Identificar los linajes de *T. cruzi* presentes en transmisión congénita de recién nacidos y madres transmisoras y no transmisoras de la enfermedad de Chagas, procedentes de Santa Cruz-Bolivia.

### **2.4.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la carga parasitaria de *T. cruzi* en muestras de madres y sus recién nacidos.
- Determinar el límite de identificación de linajes a partir de muestras de madres y sus recién nacidos.
- Identificar los linajes de *T. cruzi* mediante genotipificación empleando los marcadores COXII+AluI, ADNr 24 $\alpha$  y Mini-exon SL-IRac, a partir de madres trasmisoras y de sus recién nacidos, así como madres no trasmisoras de la enfermedad de Chagas.
- Identificar los linajes de *T. cruzi* mediante serotipificación a partir de madres trasmisoras y no trasmisoras de la enfermedad de Chagas.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Diseño del estudio.**

El diseño metodológico empleado para el presente estudio correspondió a un diseño descriptivo, donde se identificó la presencia de linajes DTUs de *T. cruzi*, en Chagas congénito mediante genotipificación empleando la técnica de PCR-RFLP y serotipificación empleando la técnica de ELISA.

Es un estudio retrospectivo ya que las muestras y la información proviene de un estudio previo de prevalencia desarrollados en dos hospitales de Bolivia, durante los años 2010 y 2014.

#### **3.2 Población de estudio.**

Las muestras fueron colectadas en el Hospital Universitario Japonés de Santa Cruz de la Sierra (población ~ 1.7 millones), y el Hospital Municipal de Camiri, (población ~ 30,000), 300 km al sur de Santa Cruz (Ver Anexo 1) (Kaplinski et al., 2015; Messenger et al., 2017)

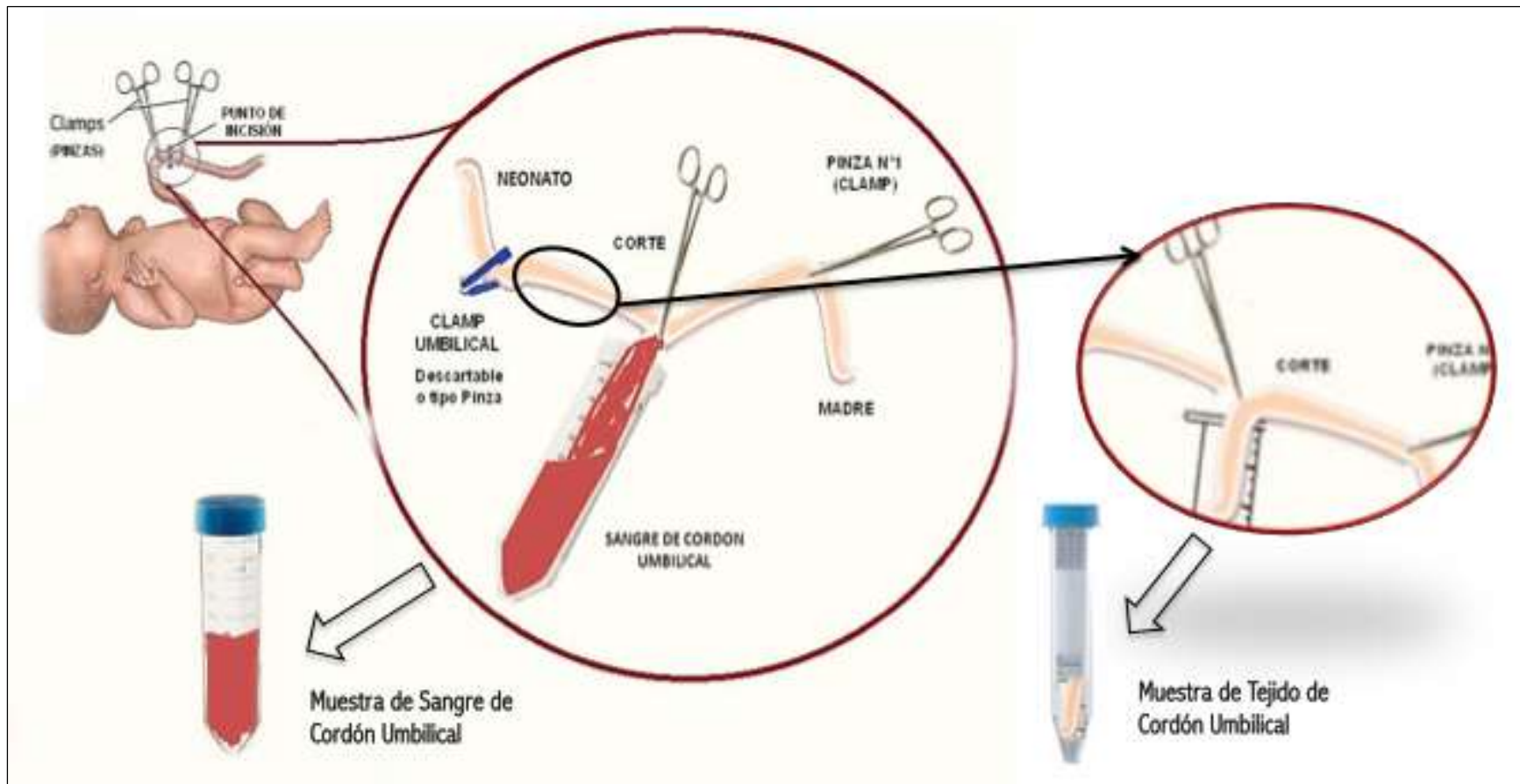
Se analizaron un total de 964 muestras de madres de las cuales 546 provenían del Hospital Universitario Japonés de Santa Cruz Bolivia y 418 muestras de madres del Hospital Municipal de Camiri

### 3.3 Muestras

Se colectaron 418 muestras de sangre venosa materna con anticoagulante inmediatamente mezcladas con un volumen de guanidina 6M, EDTA 0.2M al que se denominó GEB (Guanidine EDTA Blood) y 546 muestras sin anticoagulante (suero y coagulo).

Las muestras de sangre de los recién nacidos fueron colectadas de cordón umbilical con anticoagulante, sin anticoagulante y tejido de cordón umbilical. Figura 7. Estas muestras fueron parte del proyecto "Detección Precoz de la enfermedad de Chagas congénito en Bolivia" del Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas - LIEI con código de ética 56907.

Se utilizó material genético de 6 cepas (CH23, JRc14, A18, ERA, Bug2148 y CLBrener) de *T. cruzi* aisladas a partir de hospederos y vectores (donadas por la Dr. Louisa Messenger Department of Disease Control, Faculty of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK")



**Figura 7. Obtención de muestras del recién nacido.** Muestras de sangre y tejido de cordón umbilical.  
L. Sanchez y J. Acosta.

### **3.4 Procedimientos y Técnica:**

#### **3.4.1 Carga parasitaria de *T. cruzi* en muestras de madres y sus recién nacidos.**

##### **3.4.1.1 Extracción de ADN.**

El ADN se extrajo utilizando dos métodos: 1) El método de solventes orgánicos o fenol-cloroformo, aplicando el protocolo modificado por Sambrook (Sambrook & Russell, 2001), con este método se extrajo muestras de coágulo sanguíneo y tejido de cordón umbilical y

2) El método basado en la utilización de columnas de membrana de sílice, empleando kit comercial de QIAGEN, utilizando el sistema robotizado y automatizado denominado QiaCube (Qiagen, Alemania) (serie: 13498\_ Catalog Number: 9001292), el cual elimina el procedimiento manual del kit, con este método se extrajo muestras de GEB y tejido de cordón umbilical.

##### **3.4.1.2 Cuantificación de la carga parasitaria mediante qPCR.**

La carga parasitaria se cuantificó mediante qPCR, a partir de 500 µl de coágulo sanguíneo (materna - cordón umbilical), 300 µl de GEB (materna - cordón umbilical) y 25mg de tejido de cordón umbilical del recién nacido.

El qPCR se realizó empleando los *primers* cruzi 1 (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3'), y cruzi 2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'); y la sonda cruzi 3 (5' FAM-CACACACTGGACACCAA-3' MGB) marcada con 6 *carboxifluoresceina*. El qPCR amplifica un segmento de 166pb del ADN satélite nuclear de *T. cruzi*.

Como control interno se utilizó el gen de la RNasa-P Humano Taqman (Applied Biosystems, California USA). Las condiciones de reacción fueron: FastStar Universal Probe Master (Rox) (Roche, Alemania) 1X, primers 1 $\mu$ M, sonda 0.2  $\mu$ M, RNasa-P 0.5X y ADN extraído 5 $\mu$ l, en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l. Las condiciones de ciclamiento fueron: Denaturación inicial de 95°C por 10min, seguida por 40 ciclos de denaturación de 95°C por 15seg, hibridación de 58°C por 1min y extensión de 72°C por 45seg (Piron et al., 2007).

Se definió como ciclo umbral al primer ciclo que detectó fluorescencia por encima de la línea base. Un resultado se consideró como válido cuando el control interno amplificó eficientemente (rango de CT de 23 según las instrucciones del fabricante). Para la validación de la técnica se incluyeron 2 muestras de control positivo en cada corrida e incluyendo una nueva curva estándar realizada para cada grupo de muestras. Si el número de ciclos para los controles positivos varió en más de 0,5 ciclos, la prueba fue repetida. También se incluyó un control negativo (muestra sin el gen target) en cada corrida (Bern et al., 2009; Kaplinski et al., 2015; Messenger et al., 2017; Rendell et al., 2015).

Para desarrollar la curva de cuantificación se inóculo 1x10<sup>6</sup> parásitos de la cepa Y (DTU TcII) en muestras de sangre y tejido de cordón umbilical de pacientes sanos que no presentan la enfermedad de Chagas. Se extrajo el ADN y se realizó una dilución seriada de 1:10 hasta llegar a la cantidad mínima detectable, el límite fue de 1par-eq/ml en muestras de sangre (Coágulo y GEB) y 1par-eq/mg en muestras



de tejido. las condiciones mencionadas se basaron en los protocolos descritos anteriormente (Piron et al., 2007; Rendell et al., 2015; Schijman et al., 2011).

#### **3.4.1.3 Interpretación de resultados de qPCR.**

- Se consideró una muestra válida, cuando el control interno amplificó en un rango de CT  $22 \pm 1$ .
- Se consideró muestra positiva, cuando la curva de fluorescencia cruza el umbral menor igual a un CT de 37 (el límite de detección).
- Se considera muestra negativa, cuando la curva de fluorescencia no cruza el umbral dando lugar a la ausencia de CT o el mismo es mayor a 40.

#### **3.4.2 Límite de identificación de linajes a partir de muestras de madres y sus recién nacidos.**

Para determinar el límite de Identificación de Linajes a partir de muestra de pacientes en relación a su carga parasitaria, se realizó un ensayo infectando  $1 \times 10^7$  parásitos en muestras de coagulo, GEB y tejido de cordón umbilical, se realizó la extracción de ADN y posteriormente se realizó una dilución seriada de 1:10 hasta llegar a un parasito. Se procedió a realizar el PCR y RFLP empleando los 3 marcadores moleculares, detallados en la **sección 3.4.3.1.** y finalmente se determinó el límite de identificación de los Linajes a partir de muestras de pacientes.

### **3.4.3 Identificación de linajes de *T. cruzi* en madres trasmisoras y sus recién nacidos, así como de madres no trasmisoras de la enfermedad de Chagas.**

#### **3.4.3.1 PCR-RFLP para determinar los linajes**

La determinación de los linajes a nivel de Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) de *T. cruzi*, se realizó a partir de muestras de ADN extraídos de cepas, sangre y tejido de cordón umbilical empleando 2 técnicas:

- 1) PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando el marcador molecular COXII en combinación con la enzima de restricción AluI (COXII+AluI) (De Freitas et al., 2006) y
- 2) PCR Convencional utilizando los marcadores moleculares del ADNr 24 $\alpha$  (Miles et al., 2009; Souto, et al., 1996) y Mini-exon SL-Irac (Burgos et al., 2007).

Las condiciones de PCR para la amplificación del ADNr 24 $\alpha$  y COX II fueron: Buffer 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), MgSO<sub>4</sub> 1.5mM, dNTPs 0.25mM, primers 0.2  $\mu$ M, Taq 0.05U y 100ng/ $\mu$ l ADN genómico de los parásitos (cepas: JR c14, Chaco23 col4, Arma18 cl3, ERA cl2, Bug2148 cl1 y CL Brener), en un volumen final de reacción de 25 $\mu$ l. Las condiciones para el gen Mini-exon SL-IRac fueron: Buffer 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), MgSO<sub>4</sub>1.5mM, dNTPs 0.05mM, primers 0.2  $\mu$ M, Taq 0.05U y 100ng/ $\mu$ l de ADN genómico de los parásitos (cepas: JR c14, Chaco23 col4, Arma18 cl3, ERA cl2, Bug2148 cl1 y CL Brener), en un volumen final de reacción de 25 $\mu$ l. Cada uno de

los marcadores moleculares (COX II, ADNr 24 $\alpha$  y Mini-exon SL-IRac) tuvo un programa de corrida de PCR diferente, conforme se detalla en la Tabla 2.

El fragmento amplificado por el marcador COX II, fue posteriormente digerido con la enzima de restricción AluI, en una proporción de 0.1U por cada 16 $\mu$ l de reacción de PCR, a 37°C por 12 horas. Para el análisis de los resultados, las muestras resultantes de la amplificación y digestión fueron sometidas a electroforesis en gel agarosa al 2% con 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l de bromuro de etidio. Los patrones de bandas obtenidas en los geles fueron comparados con la Tabla 3 (D'Ávila et al., 2009; Lewis et al., 2009).

**Tabla 2. Detalles de los primers y condiciones de ciclamiento de la región o gen de interés para PCR-RFLP**

PRIMERS	Región o Gen de Interés		
	COX II	Mini-Exon SL-IRac	rDNA 24a
Primer Forward	CGTACCAATATAGTACAGAACTG	CCATATATTGTTGCATTATT	AAGGTGCGTCGACAGTGTGG
Primer Reverse	CTCCCCAGTGTGGCCTGGG	TTGTAATAGGAGTCATGTTT	TTTTCAGAATGGCCGAACAGT
CICLAMIENTO			
Denaturación inicial	94 °C por 4min	94 °C por 4min	94 °C por 4min
Denaturación	94 °C por 45seg	94 °C por 45seg	94 °C por 1min
Alineamiento	45 °C por 45seg	70 °C por 45seg (3 ciclos) 68 °C por 45seg (3 ciclos) 66 °C por 45seg (3 ciclos) 64 °C por 45seg (3 ciclos) 62 °C por 45seg (3 ciclos) 60 °C por 45seg (33 ciclos)	60 °C por 1min
Extensión	72 °C por 45seg	72 °C por 45seg	72 °C por 1min
Número total de ciclos	40	48	30
Extensión final	72 °C por 5min	72 °C por 10min	72 °C por 10min

Cox II (De Freitas et al., 2006), rDNA 24Sa (Souto et al., 1996; Lewis et al., 2009) y Mini-exon SL-IRac (Burgos et al., 2007); (D' Àvila et al., 2009).

### 3.4.3.2 Determinación de los patrones obtenidos por PCR y RFLP.

Los patrones moleculares obtenidos por PCR y RFLP de las cepas fueron determinadas empleando el programa GelAnalyzer, que realiza un cálculo automático del tamaño de cada banda de DNA de la muestra problema en base a su coeficiente de migración (Rf) y al tamaño del marcador utilizado (100pb). Para la determinación de los patrones fue necesario generar una base de datos (software: Excel) con presencia (1) y ausencia (0) de bandas obtenidas con el PCR-RFLP. Con la matriz binaria se obtuvo un dendograma de similitud y distancia basada en el coeficiente de Jaccard y el método de agrupamiento del algoritmo UPGMA. Para generar el dendograma de distancia se utilizaron los softwares D-UPGMA y The Newick Format.

La determinación de los linajes a partir de cepas aisladas de hospederos y vector se compararon con los patrones (haplotipos) mostrados en la Tabla 3, basadas en las publicaciones por D'Ávila et al., 2009 y Lewis et al., 2009.

**Tabla 3. Perfil de amplificación de marcadores utilizados para identificación de los linajes de *T. cruzi*.** La presencia de más de un valor en la celda de la tabla, indica la presencia de más de una banda en el gel de agarosa.

Linajes-DTUs	COX II	Mini-exon SL-IRac	rDNA 24S $\alpha$
Tc I	30, 81 y 264pb	150pb	110pb
Tc II	81, 82 y 212pb	150pb	125pb
Tc III	81 y 294pb	200pb	110pb
Tc IV	81 y 294pb	200pb	125pb
Tc V	81 y 294pb	150pb	110 ó 110 y 125pb
Tc VI	81 y 294pb	150pb	125pb

Tabla elaborada a partir de Datos publicados por D'Ávila et al., 2009 (CoxII, rDNA 24S $\alpha$  y Mini-exon SL-IRac) y Lewis, et al., 2009 (rDNA 24S $\alpha$ ).  
pb= pares de base.

### 3.4.4 Identificación de los linajes de *T. cruzi* a partir de sueros provenientes de madres infectadas: Madres Transmisoras y no Transmisoras

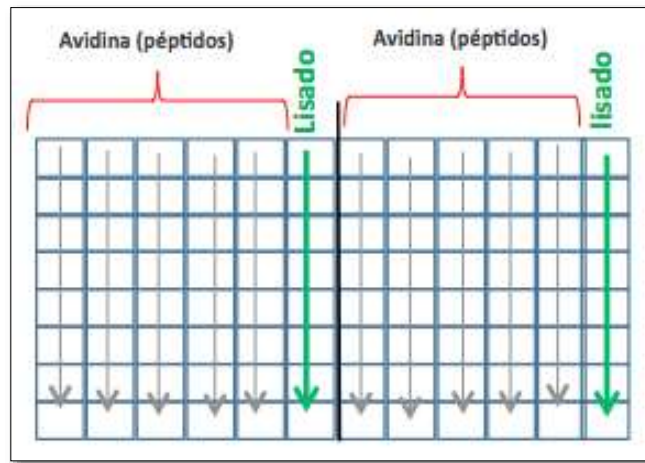
Para la identificación de linajes de *T. cruzi* a partir de suero, se consideró a madres transmisoras y no transmisoras que resultaron positivas a la enfermedad de Chagas por qPCR y serología (HAI, IFI y ELISA).

La identificación de linajes a partir de suero se basa en la detección serológica de anticuerpos IgG producidos en respuesta al antígeno específico del linaje de *T. cruzi* (Bhattacharyya et al., 2010). Para esto se aplicó la técnica de ELISA con 5 péptidos sintetizados (TSSApep-I, TSSApep-II/V/VI, TSSApep-III, TSSApep-IV y TSSApep-V/VI) para enfrentarlos con los sueros de las madres positivas e identificar de esta manera los DTUs presentes. Este procedimiento se desarrolló de acuerdo a las condiciones descritas por Battacharyya *et.al.*, 2014 con algunas modificaciones. Los péptidos sintetizados nos fueron donados por el investigador Battacharyya.

Las microplacas Nunc MaxiSorp® de 96 pozos se sensibilizaron, con dos proteínas:

1) **Avidina** (para la unión con la biotina ligada a los péptidos sintetizados: TSSApep-I, TSSApep-III, TSSApep-II/V/VI, TSSApep-IV y TSSApep-V/VI) a una concentración de 1µg/100µl/por pozo (Sigma-Aldrich) y 2) **Lisado de *T. cruzi*** a una concentración de 0.2µg/100µl/por pozo, como control positivo de la técnica de ELISA.

Estas proteínas fueron diluidas en buffer carbonato-bicarbonato pH=9.6 (Sigma-Aldrich). La placa se incubó durante toda la noche a 4°C. (Figura 8).



**Figura 8. Esquema de sensibilización de la placa de ELISA.**

Luego del periodo inicial de incubación se eliminó los restos de avidina y lisado que no se pegaron en la placa, lavando con PBS 1X/Tween20 al 0.05% por 3 veces. Los pozos fueron bloqueados con 200µl de leche descremada al 5%, cubriendo la placa e incubando por 2 horas (1 hora a 37°C y 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante). Finalizada la incubación se lavó por 3 veces, adicionando los péptidos a una concentración de 1µg/100µl/por pozo, diluido en PBS 1X/Tween20 más leche descremada al 2% y se incubó a 37°C durante 1 hora. Finalizada la incubación se lavó por 5 veces, añadiendo después el suero de las madres positivas transmisoras y no transmisoras (anticuerpo primario) a una dilución de 1/200 y se llevó a incubar a 37°C durante 1 hora. Finalizada la incubación se lavó por 6 veces, añadiendo posteriormente el anticuerpo secundario anti-IgG humano marcado con peroxidasa de rábano picante (Horse Radish Peroxidase -HRP) a una dilución de 1/15 000 y se llevó a incubar a 37°C durante 1 hora. Finalizada la incubación se lavó por 6 veces y se añadió 100µl de

sustrato/cromógeno (TMB) y se incubó en un lugar oscuro por 5 minutos. Finalmente se añadió 50µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2M y se realizó la lectura en el lector de ELISA (VERSA max microplate reader, Molecular Devices, EEUU). El procedimiento se resume en la Figura 9.



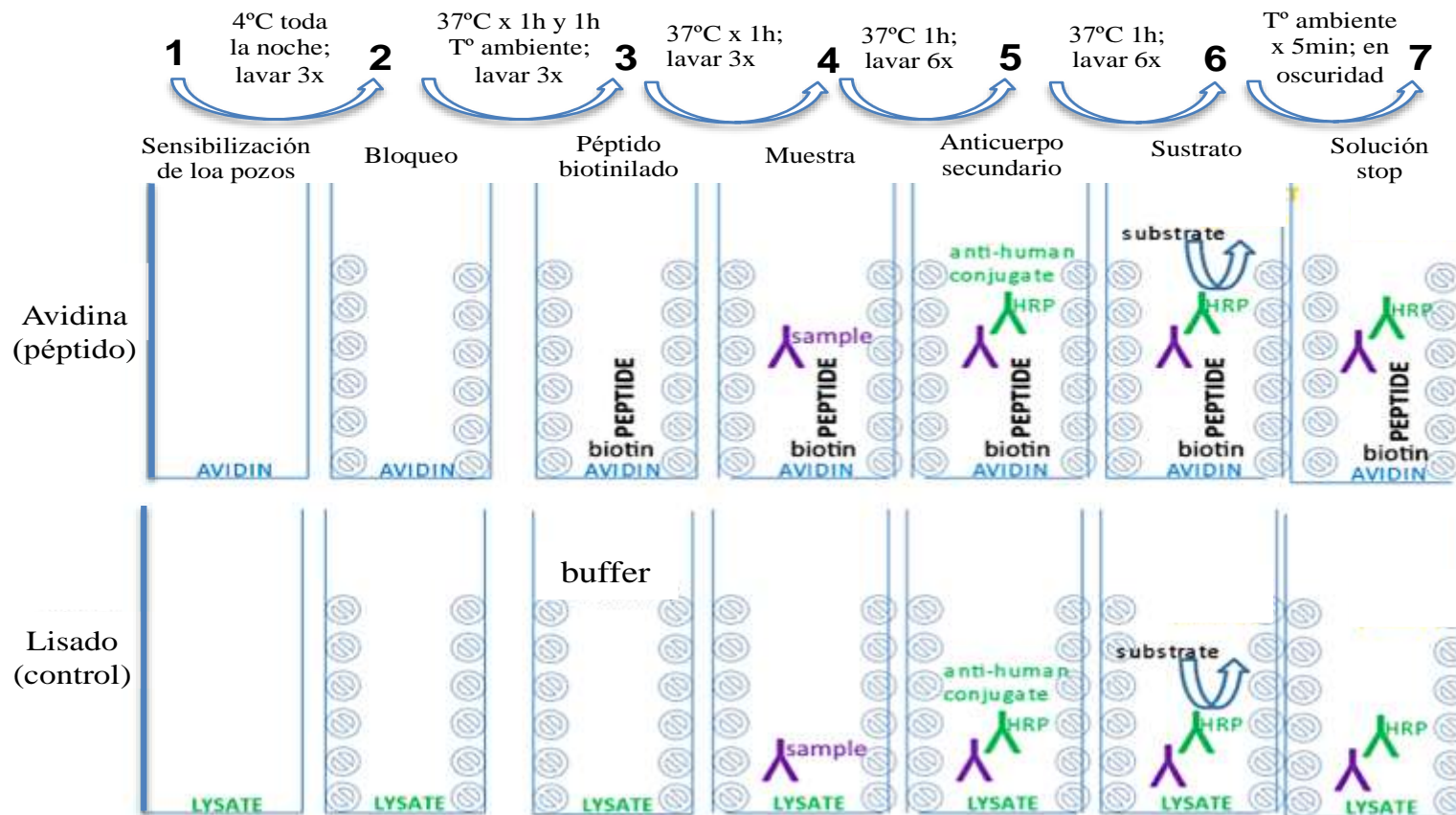


Figura 9. Procedimiento de la Técnica de serotificación. Esquema global de la técnica.

### **3.5 Consideraciones éticas.**

Este trabajo fue aprobado por el Comité Institucional de ética, CIE: Constancia 430-23-16 y el Comité Institucional de Ética de Humanos, CIE: R-31-06-16, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### **3.6 Plan de análisis.**

El análisis de los linajes de *T. cruzi* a partir de ADN provenientes de muestras de madres y sus recién nacidos infectados, se empleó la estadística descriptiva mediante el uso de frecuencia para determinar los linajes obtenidos según la técnica de PCR-RFLP en los grupos de madres transmisoras y no transmisoras. Los tamaños de bandas (haplotipos) obtenidos se determinó mediante el programa Gel Analyser. Se utilizó el algoritmo UPGMA para el agrupamiento de los linajes de *T. cruzi* presentes en las madres y sus recién nacidos infectados.

Los valores de corte de ELISA en sueros de madres y péptidos, se calcularon a partir de la media más 3 desviaciones estándar de las lecturas de OD de los sueros negativos de madres sanas provenientes de zonas endémicas de Santa Cruz, Bolivia. Se empleó el análisis estadístico t-test no apareado de 2 colas, en las madres transmisoras y no transmisoras, que reconocieron o no a los péptidos del linaje TSSA. Este análisis se desarrolló utilizando el software GraphPad Prism versión 6.0.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Determinación de la carga parasitaria de *T. cruzi* mediante qPCR en muestras de madres y sus recién nacidos.

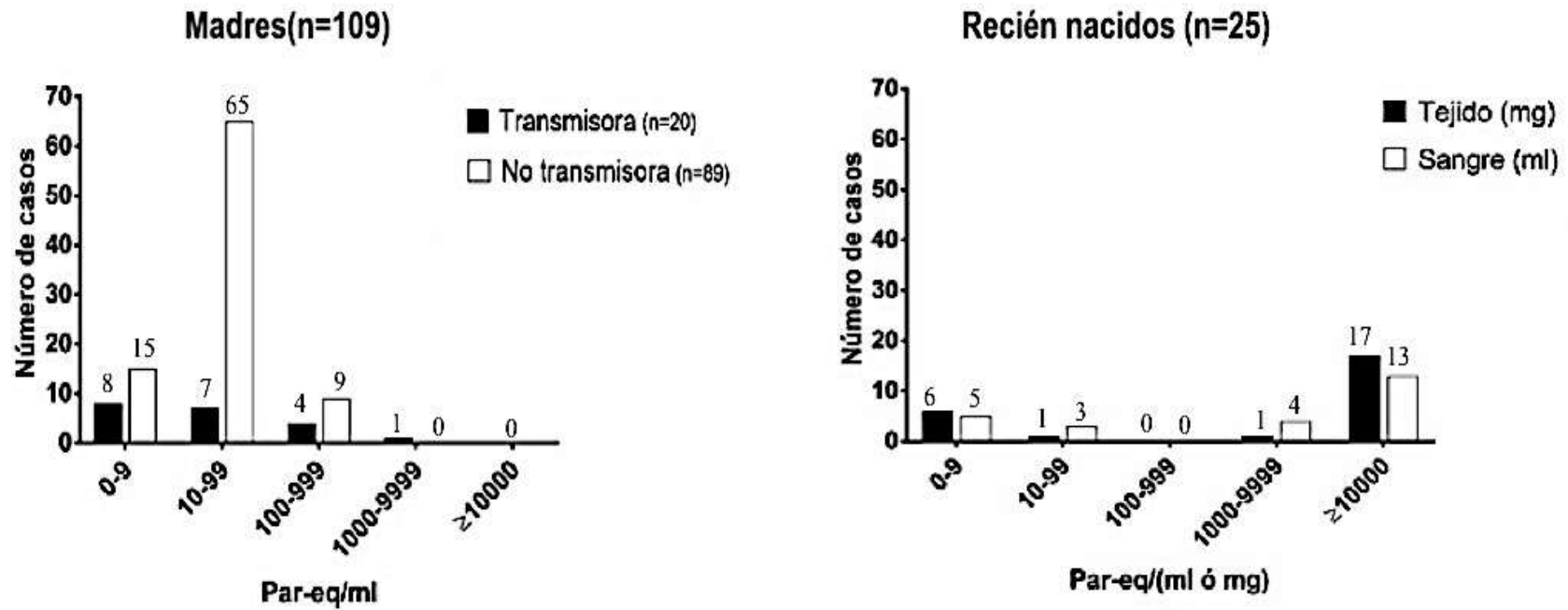
De las 946 muestras de madres analizadas por qPCR 127 fueron positivas a Chagas, de las cuales solo 109 madres tuvieron muestras de sus recién nacidos disponibles para ser usadas en el estudio.

De las 109 muestras de madres positivas a la enfermedad de Chagas, 20 madres transmitieron el parásito a sus recién nacidos y 89 madres no transmitieron el parásito.

En las muestras de sangre de madres transmisoras y no transmisoras se determinó la carga parasitaria, obteniendo lo siguiente: (a) Del grupo de madres transmisoras, 8 madres tuvieron de 0-9 par-eq/ml, 7 madres tuvieron de 10-99 par-eq/ml, 4 madres tuvieron de 100-999, 1 madre tuvo 1000-9999 par-eq/ml y ninguna madre transmisora presenta mayor o igual a  $10^4$  par-eq/ml. (b) Del grupo de madres no transmisoras, 15 madres tuvieron de 0-9 par-eq/ml, 65 madres tuvieron de 10-99 par-eq/ml, 9 madres tuvieron de 100-999 par-eq/ml, ninguna madre no transmisora tuvo 1000-9999 par-eq/ml y  $10^4$  par-eq/ml.

En las 25 muestras de sangre y tejido de cordón umbilical de recién nacidos se determinó la carga parasitaria, obteniendo lo siguiente: a) En muestras de sangre de cordón umbilical 5 recién nacidos tuvieron de 0-9 par-eq/ml, 3 recién nacidos tuvieron de 10-99 par-eq/ml, ningún recién nacido tuvo de 100-999 par-eq/ml, 1

recién nacido tuvo de 1000-9999 par-eq/ml y 13 recién nacidos tuvieron mayor o igual a  $10^4$  par-eq/ml. b) En muestras de tejido de cordón umbilical 6 recién nacidos tuvieron de 0-9 par-eq/ml, 1 recién nacido tuvo de 10-99 par-eq/ml, ningún recién nacido tuvo de 100-999 par-eq/ml, 1 recién nacido tuvo de 1000-9999 par-eq/ml y 17 recién nacidos tuvieron mayor o igual a  $10^4$  par-eq/ml (Figura 10).



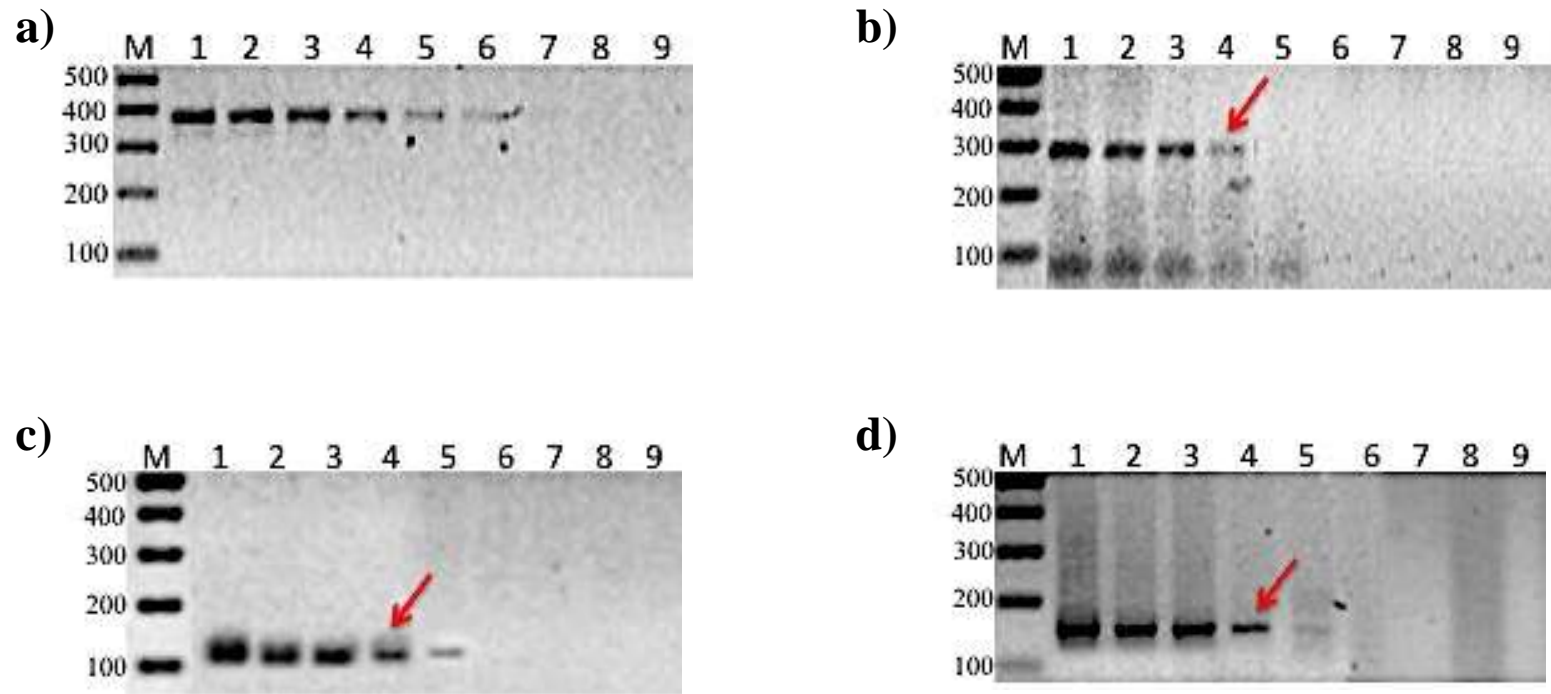
**Figura 10. Distribución de la carga parasitaria de *T. cruzi* en muestras de sangre y tejido de cordón umbilical de madres y sus recién nacidos.** La carga parasitaria fue obtenida por la técnica de qPCR satADN En la que se observa una mayor cantidad de parásitos en muestras de tejido de Cordón Umbilical. (Piron et al., 2007).

# Dos madres no tenían muestra de sangre para la prueba de qPCR; tres fueron madres de gemelos.

#### **4.2 Límite de identificación de linajes de *T. cruzi* por genotipificación a partir de muestras de sangre y tejido de cordón umbilical.**

El límite para la identificación de linajes (DTUs) a partir de muestras de sangre fue de  $10^4$  par-eq/ml, al igual que para las muestras de tejido de cordón umbilical fue de  $10^4$  par-eq/mg. En muestras con una carga parasitaria por debajo de este límite no se pudo realizar la identificación de linajes (DTUs) de *T. cruzi* (Figura 11).

No se logró realizar la identificación de DTU de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre de madres, sean estas transmisoras o no-transmisoras, debido a que la carga parasitaria más alta obtenida mediante qPCR de estas muestras fue de  $18 \times 10^2$  par-eq/ml.



**Figura 11. Amplificación por PCR-RFLP para la determinación del Límite de Identificación de linaje de *T. cruzi*.** A partir de muestras humanas infectadas con cepa Viera (DTU V). **a) COXII:** 375pb; **b) COXII+AluI:** 81 y 294pb **c) ADNr 24S:** 110pb; y **d) Mini Exon SL Rlc:** 150pb. Carril 1:  $1 \times 10^6$  par-eq/ml; Carril 2:  $5 \times 10^5$ ; Carril 3:  $1 \times 10^5$  par-eq/ml; Carril 4:  $1 \times 10^4$  par-eq/ml; Carril 5:  $1 \times 10^3$  par-eq/ml; Carril 6:  $1 \times 10^2$  par-eq/ml; Carril 7:  $1 \times 10^1$  par-eq/ml; Carril 8:  $1 \times 10^0$  par-eq/ml; Carril 9: control negativo.

### **4.3 Identificación de los linajes de *T. cruzi* mediante genotipificación de madres trasmisoras y de sus recién nacidos, así como madres no trasmisoras de la enfermedad de Chagas.**

#### **4.3.1 Verificación del patrón de DTUs (linajes) de cepas controles de *T. cruzi*.**

Con el programa Gel Analyzer se determinó los siguientes tamaños de bandas (haplotipos): Para el marcador COXII se obtuvo una banda de 375pb para todas las cepas aisladas (Figura 12 A). La restricción enzimática de este producto de amplificación (COXII+AluI) resultó en la presencia de tres patrones el primero con bandas de 81pb, y 212pb (Cepa CH23); el segundo con bandas de 30pb, 81pb y 246pb (Cepa JRc14); y el tercero con bandas de 81pb y 294pb (Cepas A18, ERA, Bug2148 y Cepa CLBrener) (Figura 12 B).

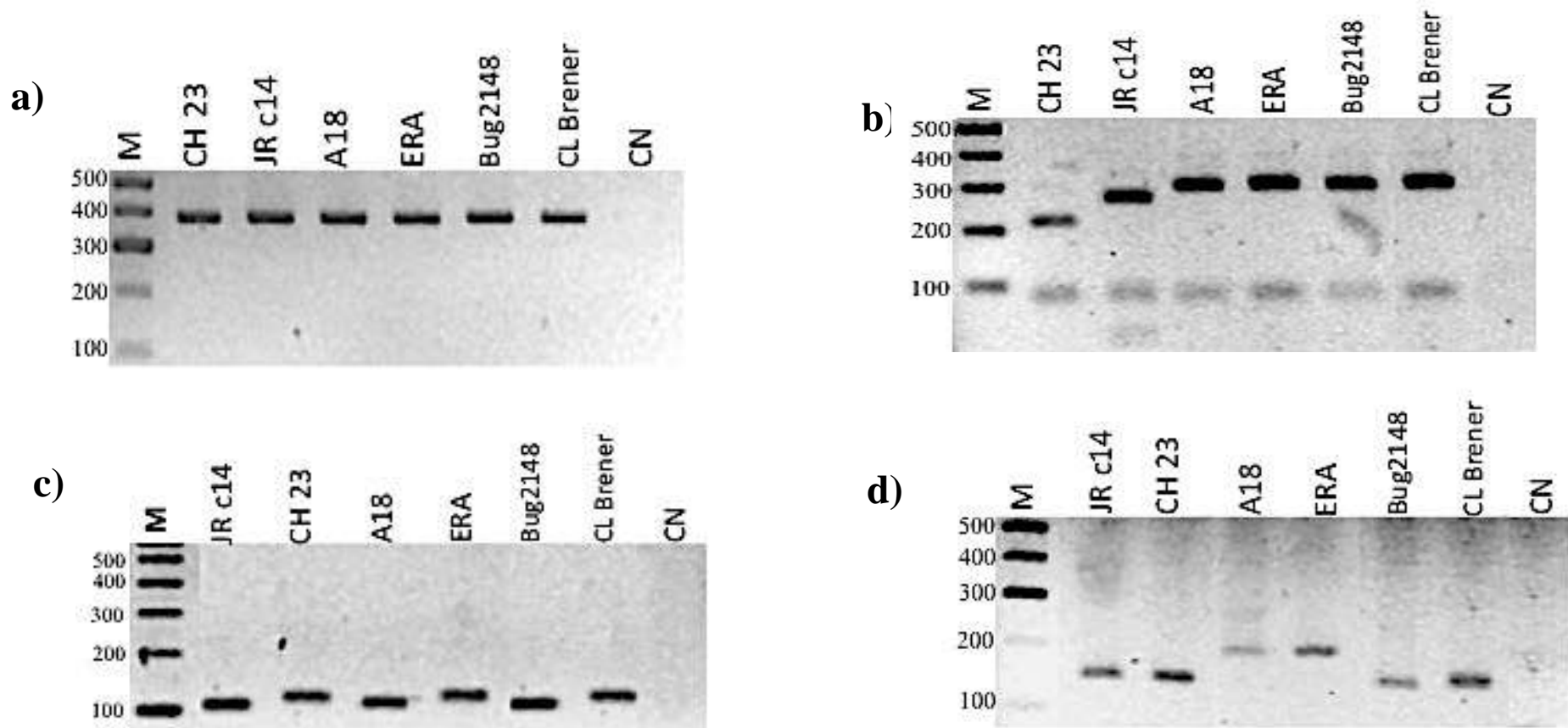
El PCR a partir del marcador ADNr 24S $\alpha$  tuvo como resultado una banda única de amplificación que varía en tamaño de acuerdo a la cepa de origen. Se observó un producto único de amplificación de 110 para las cepas JRc14, A18 y Bug2148. Igualmente se observó un producto único de 125pb en las cepas CH23, ERA y CLBrener (Figura 12 C).

El marcador Mini-exon SL-Irac también mostro un único producto que varía en tamaño de acuerdo a la cepa. Así se observó un producto de 150pb en las cepas JRc14, CH23, Bug2148 y CLBrener y un producto de 200pb en las cepas A18 y ERA (Figura 12 D).

Con los 10 haplotipos obtenidos mediante PCR y PCR-RFLP empleando los tres marcadores moleculares (COX II + AluI, ADNr 24S y Mini-exon SL-Irac). Se



determinó la presencia de los DTU TcI para la cepa JRc14, TcII para la cepa CH23, TcIII para la cepa A18, TcIV para la cepa ERA, TcV para la cepa Bug2148 y TcVI para la cepa CLBrener. Esta identificación se basó en las publicaciones previas por D' Àvila et al., 2009; Lewis, et al., 2009 (Tabla 3).



**Figura 12. Amplificación por PCR-RFLP de los marcadores COXII+AluI, ADNr 24 $\alpha$  y Mini-exon SL-IRac.** Determinación de linajes de *T. cruzi* a partir de Cepas estándares aisladas de hospederos y vector, obtenida por electroforesis en gel agarosa. **a) COXII**, Carril CH23, JRc14, A18, ERA, Bug2148 y CLBrenner: 375pb. **b) COXII + AluI**, Carril CH23: 81pb, 82pb y 212pb; Carril JRc14: 30pb, 81pb y 246pb; Carril A18: 81pb y 294pb; Carril ERA: 81pb y 294pb; Carril Bug2148: 81pb y 294pb; Carril CLBrenner: 81pb y 294pb. **c) ADNr 24 $\alpha$** , Carril JRc14: 110pb; Carril CH23: 125pb; Carril A18: 110pb; Carril ERA: 125pb; Carril Bug2148: 110pb; Carril CLBrenner: 125pb. y **d) Mini-exon SL-IRac**, Carril JRc14: 150pb; Carril CH23: 150pb; Carril A18: 200pb; Carril ERA: 200pb; Carril Bug2148: 150pb; Carril CLBrenner: 150pb. (D' Àvila *et al.*, 2009; Lewis, *et al.*, 2009).

#### **4.3.2 Identificación del DTU de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre y tejido de cordón umbilical de recién nacidos.**

De los 25 recién nacidos infectados congénitamente con la enfermedad de Chagas solo 17 muestras de tejido de cordón umbilical tuvieron carga parasitaria mayor a  $10^4$  par-eq/mg, mientras que solo 13 muestras de sangre de cordón umbilical tuvieron una carga parasitaria mayor a  $10^4$  par-eq/ml. Solo en estas muestras se logró identificar los DTUs de *T. cruzi*.

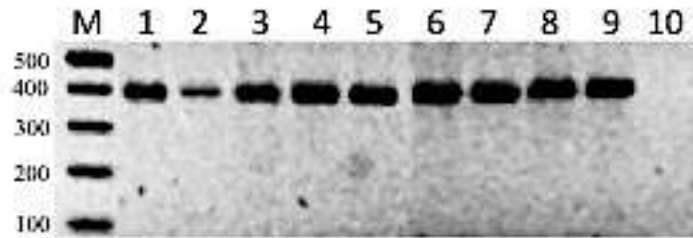
Con la ayuda del programa Gel Analyzer se determinó los siguientes tamaños de bandas (haplotipos): Para el marcador COXII se obtuvo una banda de 375pb, esta banda se obtuvo para todas las muestras de los recién nacidos (Figura 13). La digestión con la enzima AluI (COXII+AluI) resultó en la obtención de dos bandas una de 81pb y la otra de 294pb en todas las muestras de sangre y tejido de cordón umbilical de los recién nacidos (Figura 14).

La amplificación del marcador ADN $\alpha$  24S $\alpha$  resultó en la obtención de una banda de amplificación única de 110pb que se obtuvo para todas las muestras de recién nacidos con carga parasitaria mayor al límite de identificación de DTU (Figura 15).

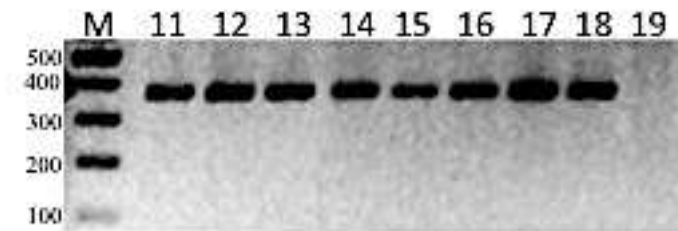
La amplificación del marcador Mini-exon SL-IRac resultó en una única banda de 150bp presente en todas las muestras de los recién nacidos con carga parasitaria mayor al límite de identificación de DTU (Figura 16).

Los resultados del análisis de los 4 marcadores moleculares comparados con la referencia en la Tabla 4 (D' Àvila et al., 2009; Lewis, et al., 2009) mostraron que el DTU de *T. cruzi* presente en todas las muestras de recién nacidos pertenecen al DTU TcV.

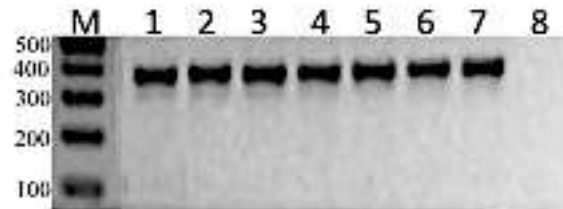
a)



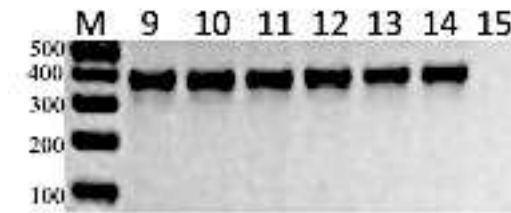
b)



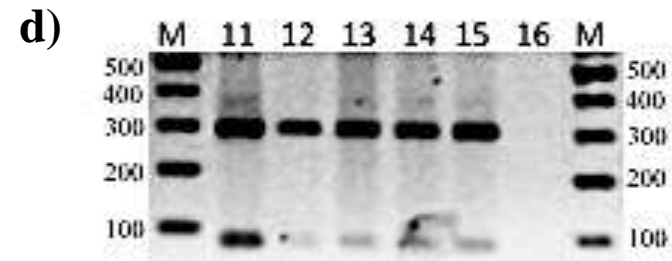
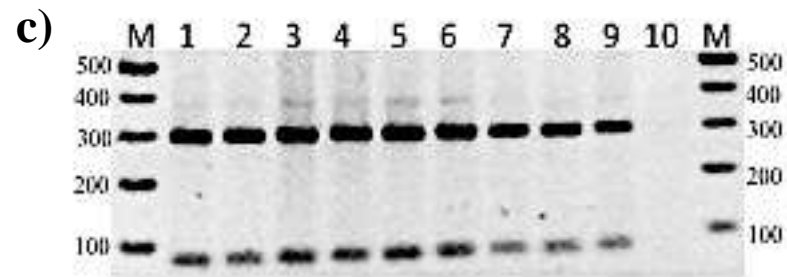
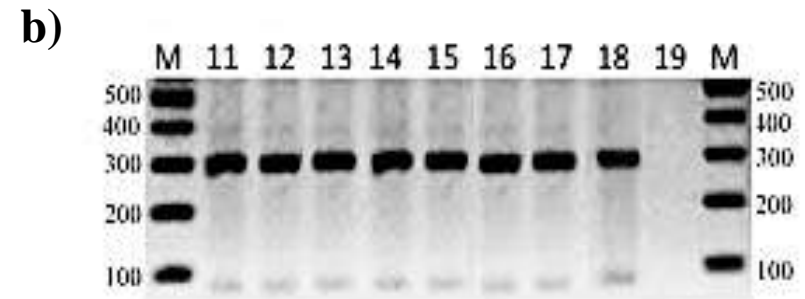
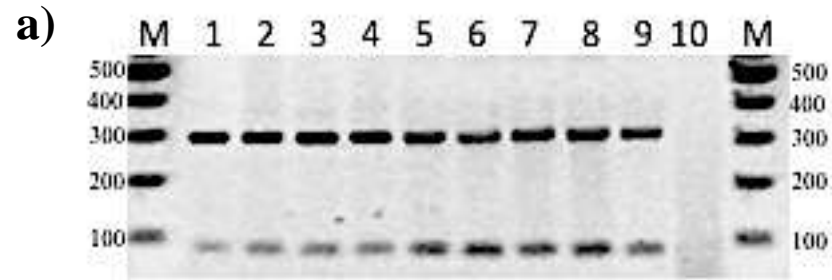
c)



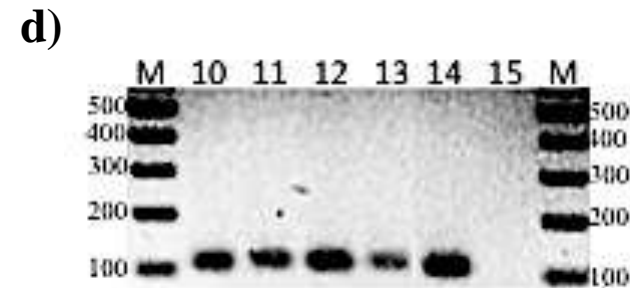
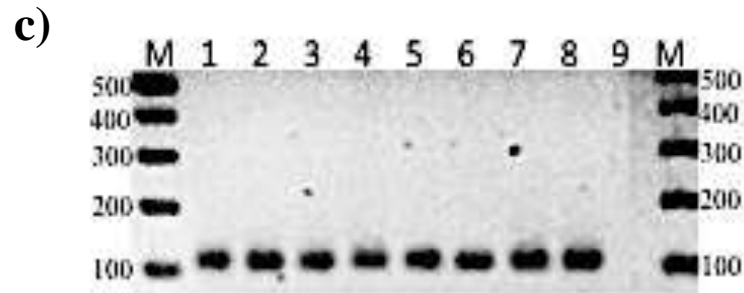
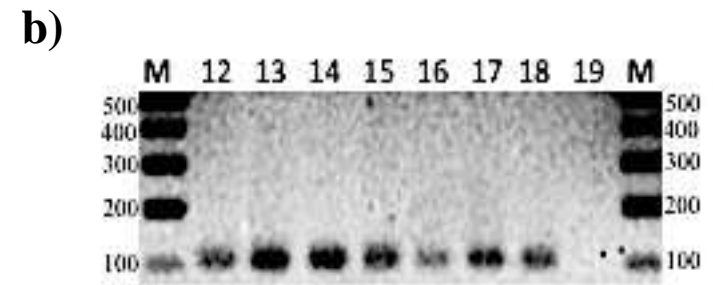
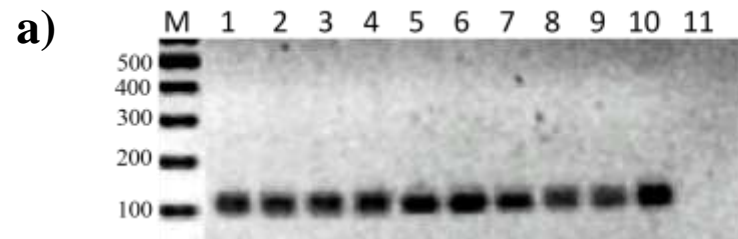
d)



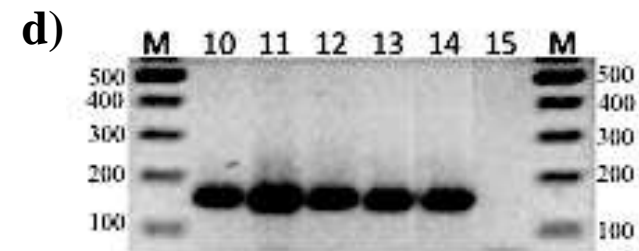
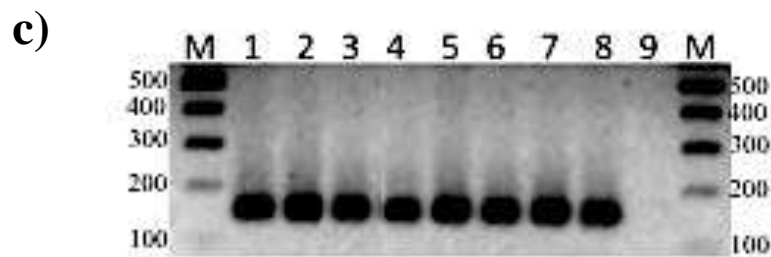
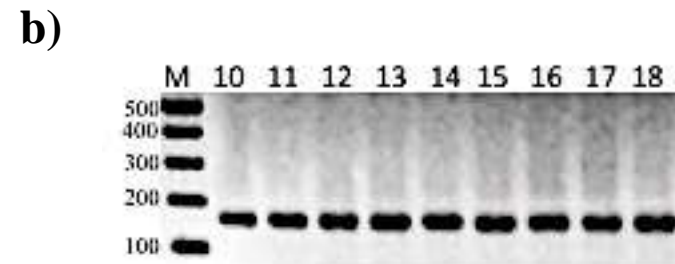
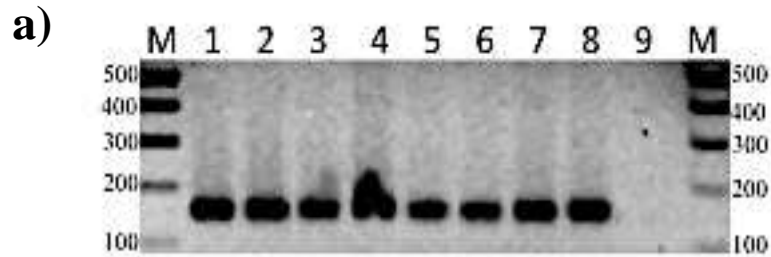
**Figura 13. Amplificación por PCR del marcador molecular COXII.** Identificación de linajes de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre y tejido de cordón umbilical del recién nacido, obtenidas por electroforesis en gel agarosa. Gel a) y b) muestras de tejido de cordón umbilical, Carril M: Marcador de 100pb; Carril 10 y 19: control negativo; Carril 1 al 9 y 11 al 18: 375pb. Gel c) y d) muestras de sangre de cordón umbilical, Carril M: Marcador de 100pb; Carril 8 y 15: control negativo; Carril 1 al 7 y 9 al 14: 375pb.



**Figura 14. PCR-RFLP del marcador molecular COXII + AluI.** Identificación de linajes de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre y tejido de cordón umbilical del recién nacido, obtenidas por electroforesis en gel agarosa. **Gel a) y b)** muestras de tejido de cordón umbilical, Carril M: Marcador de 100pb; Carril 10 y 19: control negativo; Carril 1 al 9 y 11 al 18: 81 y 294pb. **Gel c) y d)** muestras de sangre de cordón umbilical, Carril M: Marcador de 100pb; Carril 8 y 15: control negativo; Carril 1 al 9 y 11 al 15: 81 y 294pb.



**Figura 15. Amplificación por PCR del marcador molecular ADNr 24Sα.** Identificación de linajes de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre y tejido de cordón umbilical del recién nacido, obtenidas por electroforesis en gel agarosa. **Gel a) y b)** muestras de tejido de cordón umbilical, Carril M: Marcador de 100pb; Carril 11 y 19: control negativo; Carril 1 al 10 y 12 al 18: 110pb. **Gel c) y d)** muestras de sangre de cordón umbilical, Carril M: Marcador de 100pb; Carril 9 y 15: control negativo; Carril 1 al 8 y 10 al 14: 110pb.

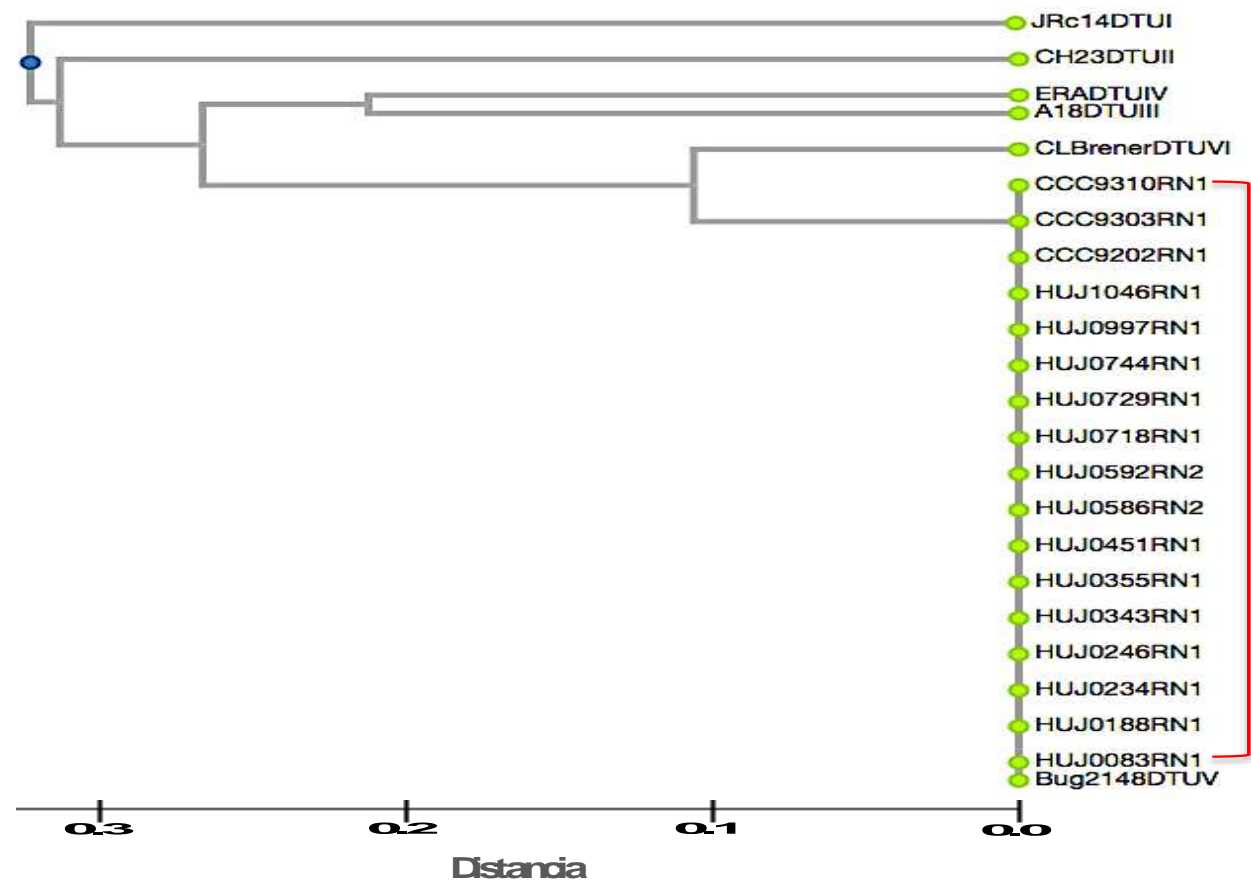


**Figura 16. Amplificación por PCR del marcador molecular Mini-exón SL-IRac.** Identificación de linajes de *T. cruzi* a partir de muestras de sangre y tejido de cordón umbilical del recién nacido, obtenidas por electroforesis en gel agarosa. **Gel a) y b)** muestras de tejido de cordón umbilical, Carril M: Marcador de 100pb; Carril 9 y 19: control negativo; Carril 1 al 8 y 10 al 18: 150pb. **Gel c) y d)** muestras de sangre de cordón umbilical, Carril M: Marcador de 100pb; Carril 9 y 15: control negativo; Carril 1 al 8 y 10 al 14: 150pb.

### **4.3.3 Dendograma de distancia en muestras de recién nacidos.**

Los resultados del análisis de los cuatro marcados moleculares analizados tanto en muestras de tejido de cordón umbilical como de sangre de los recién nacidos y el uso del Software D-UPGMA y The Newick Format, permitieron generar el dendograma (Ver Anexo 4). Todas las muestras de recién nacidos (tejido y sangre de cordón umbilical) se agruparon con la cepa Bug2148 (DTU TcV). Estos resultados muestran que en las muestras analizadas el único DTU de *T. cruzi* transmitido congénitamente es el DTU Tc V (Figura 17).





**Figura 17. Dendograma generado por los software D-UPGMA y The Newick Format.**

Dendograma generado a partir de datos cualitativos, utilizando una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0) de bandas, obtenidos por PCR-RFLP empleando 3 marcadores moleculares COXII+AluI, ADN $\alpha$  y Mini-exon SL-IRac. Para determinar la Distancia y agrupamiento de los Linajes de *T. cruzi* presentes en muestras de Tejido de Cordón Umbilical de los Recién Nacidos, transmitidos congénitamente.

La Distancia Matricial fue basada en el Coeficiente Jaccard y el método de agrupamiento del algoritmo UPGM

#### **4.4 Identificación de DTU de *T. cruzi* a partir de suero proveniente de madres infectadas.**

##### **4.4.1 ELISA de suero de madres transmisoras.**

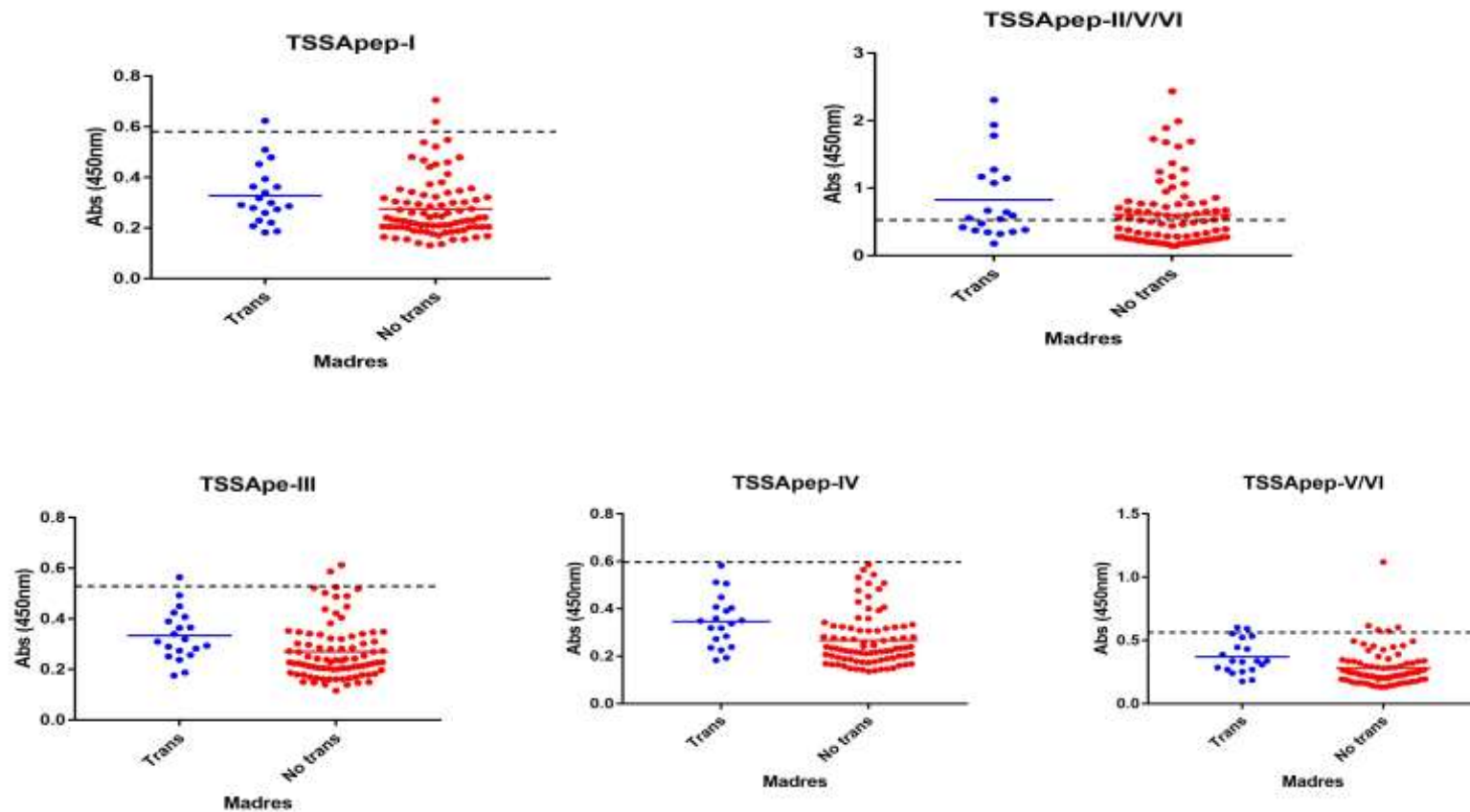
Los sueros de madres negativas (controles) provenientes de Santa Cruz, Bolivia, no reaccionaron con el lisado de *T. cruzi* ni con ninguno de los péptidos sintéticos. Sin embargo, todos los sueros de las madres positivas transmisoras reaccionaron con el lisado de *T. cruzi* (TcII) (Figura 18).

De las 20 muestras de sueros de madres positivas transmisoras, 10 (50%) sueros reconocieron únicamente al péptido TSSApep-II/V/VI común a los linajes TcI/TcV/TcVI. Uno reconoció a los péptidos TSSApep-V/VI y TSSApep-II/V/VI. Finalmente uno reconoció a los péptido TSSApep-I, TSSApep-III y TSSApep-V/VI. Ocho muestras de suero no reconocieron a ningún péptido (Figura 20).

##### **4.4.2 ELISA de sueros de madres no transmisoras.**

De las 89 muestras de sueros de madres positivas no transmisoras 34 (38.2%) sueros reconocieron únicamente al péptido TSSApep-II/V/VI común a los linajes TcI/TcV/TcVI. Tres sueros reconocieron a los péptidos TSSApep-V/VI y TSSApep-II/V/VI. Dos sueros reconocieron a los péptidos TSSApep-I, TSSApep-II/V/VI, TSSApep-III y TSSApep-V/VI (Figura 19 y 20).

Tres sueros de madres reaccionaron con todos los péptidos y 47 sueros de madres no reaccionaron con ningún péptido (Figura 20).



**Figura 18. El reconocimiento de los péptidos específico del linaje TSSA (Antígeno pequeño de Superficie de Tripanosoma), muestran una distribución no homogénea en la madres transmisoras y no transmisoras.** Cada punto de los datos representa la absorbancia (450nm) de la reacción media de los duplicados de cada muestra de suero con los péptidos; las medias del conjunto de datos de las madres transmisoras y no transmisoras se representan por líneas solidas; los punto de corte de la media + 3SD para cada péptidos con sueros de madres negativas, se muestran con líneas entrecortadas en cada gráfico; también se observa que los anticuerpos contra el péptido TSSApep-II/V/VI, son más frecuentes en los dos grupos de madres (transmisoras y no transmisoras) en comparación con los otros péptidos.

## V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó la identificación de los DTUs de *T. cruzi* mediante PCR-RFLP y serotipos mediante ELISA, a partir de muestras de madres y sus recién nacidos infectados con *T. cruzi*. Este estudio estuvo enfocado a determinar si existe alguna relación entre el tipo de DTU presente en la infección, en ambos madre y recién nacido, y la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas. Estos resultados contribuyen a entender mejor la transmisión de la enfermedad de mujeres positivas serológicamente hacia sus fetos.

En este estudio ha sido posible genotipificar y determinar el DTU, mediante el uso de tres marcadores moleculares, de los parásitos presentes en la sangre y tejido de cordón umbilical de recién nacidos. Debido a la baja carga parasitaria fue imposible determinar el DTU específico en las muestras provenientes de las madres. Sin embargo, se logró realizar una aproximación al DTU presente en la madre mediante serotipificación a partir de muestras de sueros de madres positivas transmisoras y no transmisoras mediante la técnica de ELISA. Esta metodología ha sido previamente validada por Bhattacharyya (Bhattacharyya et al., 2014) quien además reporta en la población Bolivia la presencia de los serotipos TSSApep-II/V/VI lo cual se asemeja a los serotipos encontrados en las madres transmisoras y no transmisoras en el presente estudio.

La identificación de los DTUs de *T. cruzi* directamente de muestras clínicas presenta múltiples ventajas respecto a otras metodologías de tipificación: es menos costosa, evita el uso del cultivo y los resultados se obtienen en un corto periodo de tiempo, entre otros. Contrariamente, la proporción de muestras tipificadas es relativamente baja comparada al aislamiento en cultivo, esto se debe

a la carga parasitaria presente en las muestras. Bajo ese contexto en el presente estudio se realizó un límite de genotipificación de *T. cruzi* por PCR-RFLP a partir de muestras de madres y sus recién nacidos, determinando que  $10^4$  parásitos presentes en esta muestra era óptima para la genotipificación. Así se logró determinar el DTU en el 68% (17/25) de las muestras de tejido de cordón umbilical esto disminuye a un 52% (13/25) si únicamente se emplea muestras de sangre de cordón de recién nacidos. Esta tasa de éxito de la determinación de DTU es similar a los obtenidos en reportes previos (Torrico *et al.* 2004; Virreyra *et al.*, 2007; Burgos *et al.* 2007).

El poco éxito para la genotipificación a partir de muestras de madres se ve reflejada en la baja carga parasitaria, alrededor del 99.1% de muestras de sangre de madres entre transmisoras y no transmisoras presentaron una carga parasitaria  $<10^3$  par-eq/ml. Mientras que las muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos el 52% presentaron una carga parasitaria  $\geq 10^4$  par-eq/ml y en muestras de tejido cordón umbilical el 68% presentaron una carga parasitaria  $\geq 10^4$  par-eq/ml, lo cual hizo que el ADN obtenido en las muestras de madres no sea lo suficiente para realizar la genotipificación. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Virreira del 2007, donde reporta que un 93.3% de muestras de sangre de madres presentaba  $<10$  par-eq/ml y un 76.3% de muestras de sangre de recién nacidos presentaba  $>10^3$  par-eq/ml.

La técnica empleada para la determinación de los DTUs, en el presente estudio, fue previamente validada empleando muestras de cepas estándares o controles. Los resultados obtenidos con estas cepas fueron los mismos obtenidos previamente (London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, UK”,

2015). Por otro lado, a diferencia de lo reportado por D'Àvila, el análisis del marcador ADN<sub>r</sub> 24 $\alpha$  que reporta la presencia de dos haplotipos (bandas de 110 pb y 125pb), en el presente estudio se encontró la presencia de un haplotipo de 110pb. Sin embargo Miles *et al.*, (2009), reporta que en el marcador ADN<sub>r</sub> 24 $\alpha$  puede estar presente o no el haplotipo 125pb mencionando que el haplotipo 110pb siempre debe estar presente.

Todas las muestras analizadas en el presente estudio dieron como resultado la presencia de *T. cruzi* DTU TcV. Estos resultados son similares a los previamente reportados en poblaciones de Argentina (provincias de Santiago del Estero, Chaco, Córdoba y Santa Fe) y Bolivia (Sucre y Potosí) (Burgos *et al.*, 2007); Cochabamba y Tarija (Bolivia) (Virreira *et al.*, 2007); y Chile (García *et al.*, 2014). Por otro lado, a diferencia de otros, en el presente estudio las muestras de sangre y tejido de cordón umbilical de recién nacidos fueron colectadas durante el parto, mientras que los autores mencionados emplearon en el estudio muestras de recién nacidos, y después de nacimiento (1 mes a 1 año), pudiendo confundir niños de transmisión congénita con transmisión vectorial, porque el recién nacido pudo sufrir picaduras en su vivienda, sesgando el resultado.

Para la identificación de linajes de *T. cruzi* por serología se procesaron 109 muestras de sueros de madres transmisoras y no transmisoras. De las 20 madres transmisoras 15 madres representan a los 17 niños tipificados. De las 15 madres, 5 madres reconocieron únicamente al péptido TSSA<sub>pep-II/V/VI</sub>, una muestra además reconoció a los péptidos I, III y /VI. Nueve madres no reconocieron a ninguno de los péptidos empleados en la prueba de ELISA. Estos resultados confirman la presencia del DTU TcV en las muestras de cordón umbilical. El

reconocimiento de todos los péptidos por muestras de madres no transmisoras tal vez se deba en algunos casos a reacción cruzada o a la baja respuesta inmune del individuo a determinados linajes.

La tipificación de *T. cruzi* basada en la amplificación y análisis de los marcadores moleculares COXII+AluI, ADNr 24S $\alpha$  y Mini-exon SL-IRac; constituye una de las mejores alternativas, siempre que se cuente con una carga parasitaria adecuada. En la actualidad sigue siendo dificultoso poder determinar el linaje en pacientes en fase crónica, por la dificultad de aislar y genotipificar a *T. cruzi*. Incluso si se lograra aislar al parásito en un hemocultivo, los resultados no podrían ser representativos, porque *T. cruzi* se replica intracelularmente y algunos parásitos con genotipo diferente al circulante pueden ser secuestrados en los tejidos no siendo aislados en el hemocultivo (Vago et al., 2000). Por otro lado basados en nuestros resultados los péptidos derivados de la proteína TSSA no permite determinar todos los linajes, lo cual puede deberse a la baja sensibilidad de estos antígenos o a la reacción cruzada de algunos péptidos, por lo que sería bueno seguir evaluando estos péptidos en otras poblaciones.

## VI. CONCLUSIÓN

- La carga parasitaria promedio de *T. cruzi* en muestras de sangre y tejido de cordón umbilical de recién nacidos respectivamente determinada mediante qPCR fue  $1.7 \times 10^5$  y  $3.0 \times 10^7$  par-eq/ml.
- No se observó diferencia en la carga parasitaria de madres transmisoras ( $1.4 \times 10^2$ ) y madres no transmisoras ( $4.8 \times 10^1$ )
- La identificación de los linajes de *T. cruzi*, mediante análisis molecular en muestras de recién nacidos fue posible solo cuando la carga parasitaria fue mayor a  $10^4$  par-eq/ml.
- No fue posible identificar los linajes de *T. cruzi* mediante el análisis molecular partir de muestras de sangre de las madres transmisoras y no transmisoras debido a que la carga parasitaria fue inferior a  $10^4$  par-eq/ml.
- El linaje de *T. cruzi* identificado en los recién nacidos de la población de Santa Cruz, Bolivia fue el DTU TcV
- El epítipo TSSA<sub>pep-II/V/VI</sub> común a los linajes TcII/TcV/TcVI fue el único identificado, en 50% de suero de madres transmisoras y 38.2% en suero de madres no transmisoras de la enfermedad de Chagas de la población de Santa Cruz, Bolivia.



## VII. RECOMENDACIONES

- Explorar el uso de mayor volumen de muestra de sangre para el proceso de extracción de tal forma que se pueda facilitar la genotipificación.
- Se recomienda realizar estudios similares en muestras provenientes de zonas endémicas para otros DTU de *T. cruzi* con el fin de conocer si otros DTUs se transmiten por vía congénita.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, S. G., & Magalhães, J. B. (1996). Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 30(1), 27–35. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000100006>
- Avila, H. A., Pereira, J. B., Thiemann, O., De Paiva, E., Degraeve, W., Morel, C. M., & Simpson, L. (1993). 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. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(9), 2421–2426.
- Bern, C. (2009). Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1667–1674. <https://doi.org/10.1086/648070>
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 1258–1259.
- Bern, C., Martin, D. L., & Gilman, R. H. (2011). Acute and Congenital Chagas Disease. *Advances in Parasitology*, 75, 19–47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>
- Bhattacharyya, T., Brooks, J., Yeo, M., Carrasco, H. J., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., & Miles, M. A. (2010). Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *International Journal for Parasitology*, 40(8), 921–928. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.002>
- Bhattacharyya, T., Falconar, A. K., Luquetti, A. O., Costales, J. A., Grijalva, M. J., Lewis, M. D., ... Miles, M. A. (2014). Development of Peptide-Based Lineage-Specific Serology for Chronic Chagas Disease: Geographical and Clinical Distribution of Epitope Recognition. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002892>
- Brisse, S., Verhoef, J., & Tibayrenc, M. (2001). Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*, 31(11), 1218–1226. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00238-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00238-7)
- Buekens, P., Almendares, O., Carlier, Y., Dumonteil, E., Eberhard, M., Gamboa-Leon, R., ... Xiong, X. (2008). Mother-to-child transmission of chagas' disease in North America: Why don't we do more? *Maternal and Child Health Journal*, 12(3), 283–286. <https://doi.org/10.1007/s10995-007-0246-8>

- Burgos, J. M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H. M. S., Seidenstein, M. E., ... Schijman, A. G. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, 37(12), 1319–1327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.015>
- Buscaglia Carlos A., Campo Vanina A., F. A. C. C. and D. N. J. M. (2006). *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol*, 4(March), 229–236.
- Camandaroba, E. L. P., Pinheiro Lima, C. M., & Andrade, S. G. (2002). Oral transmission of Chagas disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(2), 97–103. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000200008>
- Campbell, D. a, Westenberger, S. J., & Sturm, N. R. (2004). The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Current Molecular Medicine*, 4(6), 549–562. <https://doi.org/10.2174/1566524043360249>
- Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Luquetti, A. O., & Buekens, P. (2015). Congenital Chagas disease: An update. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 363–368. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140405>
- Carlier, Y., & Truyens, C. (2015). Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Tropica*, 151(1), 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>
- Chiari, E., Carlos Pinto Dias, J., & Andrade Chiari, C. (1989). Hemocultures for the Parasitological Diagnosis of Human Chronic Chagas' Disease. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22(1), 19–23.
- D'Ávila, D. A., Macedo, A. M., Valadares, H. M. S., Gontijo, E. D., De Castro, A. M., Machado, C. R., ... Galvão, L. M. C. (2009). Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), 1718–1725. <https://doi.org/10.1128/JCM.01658-08>
- De Freitas, J. M., Augusto-Pinto, L., Pimenta, J. R., Bastos-Rodrigues, L., Gonçalves, V. F., Teixeira, S. M. R., ... Pena, S. D. J. (2006). Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathogens*, 2(3), 0226–0235. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020024>
- De Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 1, 1–21. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-1-3>

- Gaceta Medica Boliviana. (2011). Situacional de la Epidemiología y el Control de la Enfermedad de Chagas en Bolivia. *Gaceta Médica Boliviana*, 34(1), 57.
- Garcia, A., Ortiz, S., Iribarren, C., Bahamonde, M. I., & Solari, A. (2014). Congenital co-infection with different *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitology International*, 63(1), 138–139. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.10.010>
- Garcia, E. S., Genta, F. A., De Azambuja, P., & Schaub, G. A. (2010). Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology*, 26(10), 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.07.003>
- Herrera, C., Bargues, M. D., Fajardo, A., Montilla, M., Triana, O., Vallejo, G. A., & Guhl, F. (2007). Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(4), 535–539. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.12.003>
- Kaplinski, M., Jois, M., Galdos-Cardenas, G., Rendell, V. R., Shah, V., Do, R. Q., ... Bern, C. (2015). Sustained Domestic Vector Exposure Is Associated with Increased Chagas Cardiomyopathy Risk but Decreased Parasitemia and Congenital Transmission Risk among Young Women in Bolivia. *Clinical Infectious Diseases*, 61(6), 918–926. <https://doi.org/10.1093/cid/civ446>
- Katzin VJ, Añasco N, de Isola EL, G. C. S. (1983). Characterization of *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms differentiated from epimastigotes. A comparative study between both stages. *Inst Med Trop*, 25(2), 55–61.
- Kawashita, S. Y., Sanson, G. F. O., Fernandes, O., Zingales, B., & Briones, M. R. S. (2001). Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 18(12), 2250–2259. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003771>
- Kirchoff L. (2000). *Trypanosoma* species (American Trypanosomiasis, Chagas disease): biology of trypanosomes. *Prinnciples and Practice of Infectious Diseases*, 28(5th ed), 45–53.
- L. Messenger, R. Gilman, M. Verastegui, & et al. (2017). Toward Improving Early Diagnosis of Congenital Chagas Disease in an Endemic Setting. *Clinical Infectious Diseases*, 65(2), 268–275. <https://doi.org/10.1093/cid/cix277>
- Lewis, M.D., Ma, J., Yeo, M., Carrasco, H.J., Llewellyn, M.S., Miles, M.A. (2009). Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Trop. Med.*, 81, 1041–1049.

- Macedo, a M., & Pena, S. D. (1998). Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 14(3), 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01179-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01179-4)
- Maldonado, A. (2009). Identificación Molecular de *Trypanosoma cruzi* en triatomíneos de tres ecotopos del estado de Colima. *Facultad de Medicina. Universidad de Colima, Mexico*.
- Miles, M.A., Cedillos, R.A., Pova, M.M., de Souza, A.A., Prata, A., Macedo, V. (1981). Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet (London, England)*, 1, 1338–1340.
- Miles, M.A., Cibulskis, R.E. (1986). Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.*, 2, 94–97.
- Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., ... Mauricio, I. L. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: Looking back and to the future. *Parasitology*, 136(12), 1509–1528. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990977>
- Ministerio de Salud y Deportes Bolivia. (2011). Manual de normas para el diagnóstico y tratamiento de chagas congénito.
- Moncayo, & Silveira, A. C. (2009). Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: Epidemiology, surveillance, and health policies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 17–30. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00004-6>
- Morel, C., Chiari, E., Camargo, E. P., Mattei, D. M., Romanha, a J., & Simpson, L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6810–6814. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.11.6810>
- Moya, P., Basso, B., & Moretti, E. (2010). Enfermedad de Chagas congénita : Aspectos epidemiológicos , clínicos , diagnósticos y terapéuticos . Estado actual y perspectivas. *Universidad Nacional de Córdoba*, 1–13. Retrieved from <http://enfermedadchagas.com.ar/congenito.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (1991). Control of Chagas' disease - Report of a WHO Expert Committee. *OMS/ WHO: World Health Organization*), *WHO Techni*, report series 811.

- Organización Mundial de la Salud (OMS/ WHO). (2013). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*.
- Organizacion Mundial de Salud. (2017). Chagas disease (American trypanosomiasis). (OMS/WHO), *Fact sheet*, Actualizado: Marzo.
- Organización Panamericana de la Salud. (2004). Enfermedad de Chagas Congénita, su epidemiología y manejo. (OPS)-OMS, *Montevideo*.
- Organización Panamericana de la Salud. (2006). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas. *OPS*, 1–29.
- Pinto-Días, J.C., Rodríguez-Coura, J. (1997). Clínica e terapéutica da doença de Chagas. *Uma Abordagen Prática Para o Clínico Geral*, Edit FIOCR.
- Pinto-Días, J. . (1990). Enfermedad de Chagas. Epidemiología Clínica Terapéutica. *Programa de Salud Humana, Buenos Air*.
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., ... Sauleda, S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, 103(3), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.019>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet (London, England)*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rendell, V. R., Gilman, R. H., Valencia, E., Galdos-Cardenas, G., Verastegui, M., Sanchez, L., ... Bern, C. (2015). *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: Implications for congenital transmission risk. *PLoS ONE*, 10(3), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119527>
- Romanha, Á. J., da Silva Pereira, A. A., Chiari, E., & Kilgour, V. (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: Changes after prolonged subculture. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry And*, 62(2), 139–142. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(79\)90299-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(79)90299-2)
- Sambrook, J., Russell, D. (2001). Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol: Chloroform. Adapted from “Commonly Used Techniques in Molecular Cloning,.” In *Molecular Cloning* (3rd editio, p. Appendix 8). NY, USA.
- Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A. M., ... Ladzins, J. (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1).

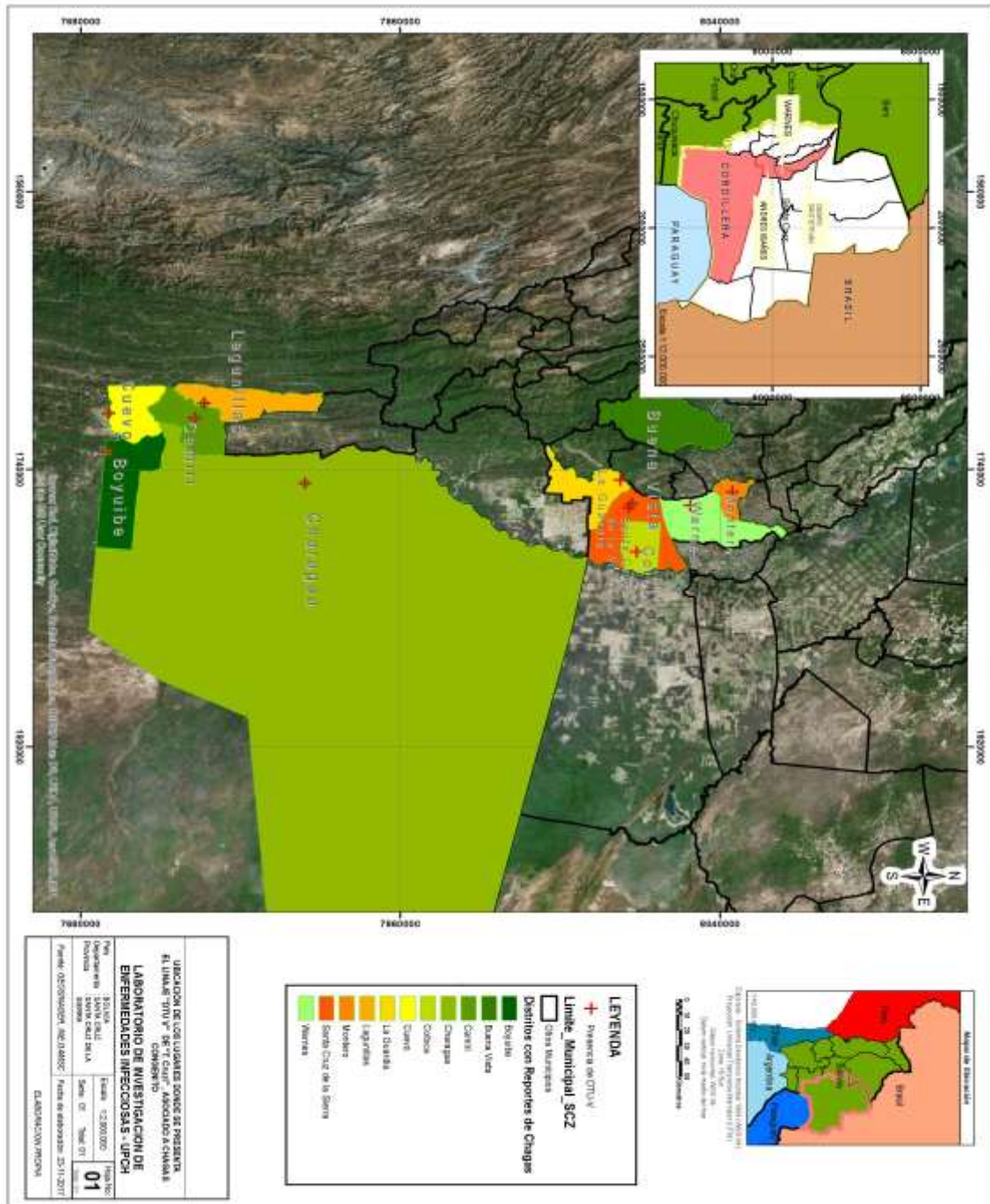
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>

- Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(SUPPL. 1), 75–85. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000093>
- Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, 110(2–3), 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>
- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A., & Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83(2), 141–152. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02755-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02755-7)
- Souto, R. P., Fernandesb, O., Macedo, A. M., Campbelld, D. A., & Zingales, B. (1996). *Parasitology*, 83, 141–152.
- Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 85–104. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00180-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00180-X)
- Tibayrenc, M., & Ayala, F. J. (1991). Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitology Today*, 7(9), 228–232. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90234-F](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90234-F)
- Torrice, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M. C., Dramaix, M., ... Carlier, Y. (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.ajtmh.2004.02.001> [pii]
- Torrice, F., Vega, C. A., Suarez, E., Tellez, T., Brutus, L., Rodriguez, P., ... Carlier, Y. (2006). Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease? *Tropical Medicine and International Health*, 11(5), 628–635. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01623.x>
- Vago, A. R., Andrade, L. O., Leite, A. A., d'Ávila Reis, D., Macedo, A. M., Adad, S. J., ... Pena, S. D. J. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic chagas disease: Differential distribution of genetic types into diverse organs. *American Journal of Pathology*, 156(5), 1805–1809. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65052-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65052-3)

- Vargas, N., Pedroso, A., & Zingales, B. (2004). Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *138*(1), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.08.005>
- Virreira, M., Alonso-Vega, C., Solano, M., Jijena, J., Brutus, L., Bustamante, Z., ... Svoboda, M. (2006). Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *75*(5), 871–879. <https://doi.org/75/5/871> [pii]
- Virreira, M., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Brutus, L., Jijena, J., Torrico, F., ... Svoboda, M. (2007). Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. <https://doi.org/77/1/102> [pii]
- Wendel, S. Brener, Z. Camargo, A. Rassi, A. (1992). Chagas' disease. *Lancet (London, England)*, *1*, 426–428.
- Westenberger, S. J., Barnabé, C., Campbell, D. A., & Sturm, N. R. (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, *171*(2), 527–543. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.038745>
- Zingales, B., Andrade, S. G., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., & Guhl, F. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to Tc. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(November), 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., ... Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>



## IX. ANEXOS



Anexo 1. Mapa de Ubicación del Linaje DTU TcV de *T. cruzi*, asociado a Chagas congénito.

**Anexo 2. Matriz de similitud calculada con el coeficiente de Jaccard.** Cepas de *T. cruzi* aisladas de Hospederos y Vector.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
JRc14(DTUI)	1.000	0.250	0.286	0.125	0.429	0.286
CH23(DTUII)		1.000	0.125	0.286	0.429	0.500
A18(DTUIII)			1.000	0.600	0.500	0.333
ERA(DTUIV)				1.000	0.500	0.600
Bug2148(DTUV)					1.000	0.800
CLBrener(DTUVI)						1.000

**Anexo 3. Matriz de distancia basada en el coeficiente de Jaccard.** Cepas de *T. cruzi* aisladas de Hospederos y Vector.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
JRc14(DTUI)	0.000	0.750	0.714	0.875	0.571	0.714
CH23(DTUII)		0.000	0.875	0.714	0.571	0.500
A18(DTUIII)			0.000	0.400	0.500	0.667
ERA(DTUIV)				0.000	0.500	0.400
Bug2148(DTUV)					0.000	0.200
CLBrener(DTUVI)						0.000

**Anexo 4. Matriz de distancia basada en el coeficiente de Jaccard.** Muestras de Tejido de Cordón Umbilical de recién nacidos infectados congénitamente con la enfermedad de Chagas; y Cepas de *T. cruzi* aisladas de Hospederos y Vector.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	P	Q	R	S	T	U	V		
JRc14DTUI	0.000	0.750	0.714	0.875	0.571	0.714	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	
CH23DTUII		0.000	0.875	0.714	0.571	0.500	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	0.571	
A18DTUIII			0.000	0.400	0.500	0.667	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
ERADTUIV				0.000	0.500	0.400	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
Bug2148DTUV					0.000	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CLBrenerDTUVI						0.000	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200	0.200
HUJ0083RN1							0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0188RN1								0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0234RN1									0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0246RN1										0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0343RN1											0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0355RN1												0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0451RN1													0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0586RN2														0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0592RN2															0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0718RN1																0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0729RN1																	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0744RN1																		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ0997RN1																			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HUJ1046RN1																				0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CCC9202RN1																					0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
CCC9303RN1																						0.000	0.000	0.000	0.000
CCC9310RN1																							0.000	0.000	0.000