

Simposio

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ENFERMEDADES PARASITARIAS -I

Molecular epidemiology of Chagas disease: gaps of knowledge and research priorities

Bianca Zingales

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Infection with *Trypanosoma cruzi* is a complex zoonosis, transmitted by many triatomine species and sustained by over seventy genera of mammalian reservoir hosts. *Trypanosoma cruzi* has a broad endemic range that extends from the southern United States to Argentinean Patagonia.

The human infection, denominated Chagas disease, is found mostly in South and Central America. The spectrum of pathological outcomes associated with acute and chronic Chagas disease ranges from subclinical through the cardiac and digestive syndromes to death. Specific outcomes may be determined by a variety of aspects including parasite genetics, host genetics, and geographical factors.

Variability of the *T. cruzi* genome, genotypes and phenotypes are well recognized. Enumeration of relevant groups for *T. cruzi* has generated an oscillation between low (Anonymous, 1999; Miles, *et al.*, 1978; Souto, *et al.*, 1996) and high numbers (Tibayrenc and Ayala, 1988) and is currently resting at six discrete typing units (DTU), named TcI to TcVI (Zingales, *et al.*, 2009).

Based on the amplification of 24Ss rDNA and ITS of mini-exon genes (Souto, *et al.*, 1996), parasite strains were initially genotyped into the two major TcI and TcII groups (Anonymous, 1999). TcI was found associated with the silvatic cycle of transmission, arboreal mammals and opossums; while TcII was associated with the domestic cycle and a terrestrial niche (Yeo, *et al.*, 2005; Zingales, *et al.*, 1998).

A geographical distribution gradient was also observed, with TcI strains predominating in the Amazon basin, northern countries of South America, Central America and Mexico, while TcII prevailed in the southern part of South America. Interestingly, the chronic mega syndromes are common in the south, but rare in the north, implying that TcII strains could be more pathogenic than TcI strains. However, clinical presentations of TcI at north of the Amazon can include a symptomatic acute phase

and chronic chagasic cardiomyopathy, which may be fatal.

At this point, some stimulating questions can be formulated. Are TcI strains circulating in northern countries of Latin America genetically different from southern countries TcI strains? Are the cardiac forms caused by TcI milder than those caused by TcII? Which characteristics of TcII strains determine the digestive form? Does the host immune genetics influence the outcome of Chagas chronic infection? Additionally, and in regard to the clinic manifestations, does the severity of symptoms of the acute phase correlate with the severity of the chronic phase? Does the magnitude of the parasite inoculum correlate with the severity of the acute or chronic phase? Which parasite or host genetic characteristics determine that ~3% of the asymptomatic patients develop severe chronic manifestations?

Differences in susceptibilities of *T. cruzi* strains to the two drugs currently used to treat Chagas disease, benznidazole and nifurtimox, have been reported. Regional differences in the decline of antibody levels to *T. cruzi* in patients treated with benznidazole have been observed, with reductions occurring more rapidly in the northern countries than in the southern Cone (Yun, *et al.*, 2009).

Gaps of knowledge: Are TcI strains more susceptible to benznidazole? Is the immune response of individuals of northern countries more efficient in the parasite clearance? In addition, the development of tests to assess cure is urgently needed, as is the replacement of the two available drugs, which have substantial limitations.

There is good knowledge about the geographical distribution of the *T. cruzi* vector species. *Rhodnius* and *Panstrongylus* species and *Triatoma dimidiata* encountered in Mexico, Central America, Andean countries and Amazonia were generally recorded as infected with TcI. On the other hand, TcII strains were predominantly found in *T. infestans*

and *T. brasiliensis* in southern countries. These observations argue in favor of the role of triatomine species as “biological filters” in the transmission of TcI and TcII.

The recent revision of *T. cruzi* intraspecific nomenclature (Zingales, *et al.*, 2009) is aimed at improving communication within the scientific community and the deeper understanding of the epidemiology, pathogenicity and basic biological questions associated with each of the six DTU. Revision of data of the literature indicates that five of the six DTUs cause human Chagas disease (Miles, *et al.*, 2009). TcIII is virtually absent from humans, albeit found in domestic dogs in Paraguay and Brazil, and, accordingly, in the future it may become a source of human infection. TcIV is rarely found in humans but is the secondary cause of Chagas disease in Venezuela. TcII, V and VI are the main causes of Chagas disease in the southern countries; TcII particularly in Brazil, TcV and VI especially in Bolivia, Chile and the Gran Chaco.

A straightforward and reproducible genotyping strategy for the identification of *T. cruzi* DTUs must be developed for a wider analysis of the ongoing dynamics of *T. cruzi* transmission cycles among the vectors, reservoirs and humans in different endemic areas. At present, two three-marker sequential typing strategies (D'Avila, *et al.*, 2009; Lewis, *et al.*, 2009), as well as a four sequential multiplex real time PCR assays using TaqMan probes have been proposed. The validation and resolution power of these methodologies should be assessed in a multicentric study in which the participants analyze the same set of DTU reference strains and combination of DTUs, along with natural isolates from a broad range of hosts and geographical locations.

The methodology must be as simple as possible if we expect wide usage in laboratory, clinical and field settings. New genotypes identified using the basal typing protocols can be further characterized by more complex technologies. This seems to be the case of strains isolated from bats that show a new combination of genes, with a TcII-mini-exon pattern and a novel LSU rDNA product (Marcili, *et al.*, 2009). This group of isolates earned the provisional title of ‘Tcbat’ and awaits further characterization for an ultimate DTU assignment, potentially defining a seventh DTU-TcVII.

Analysis of sequence variation (Herrera, *et al.*, 2009) and microsatellite markers (Llewellyn, *et al.*, 2009) revealed that significant genetic diversity has accumulated within TcI and provided important

insights into the dynamics of TcI transmission (Cura, *et al.*, 2010; Falla, *et al.*, 2009). Most certainly, the analytical power of higher throughput comparative genomics will disclose genetic diversity within the other DTUs.

The information regarding clinical manifestations and parasite genotype can dictate future interventions to the benefit of the affected populations. However such conclusions are complicated for two main reasons. Isolates from blood do not necessarily reveal the full complement of infecting parasite lineages and parasite selection may occur during isolation procedures for genetic analysis. A hypothetical solution to these problems would be to develop a DTU-specific serology that could be used to diagnose all the DTUs infecting an individual and facilitate comparisons of virulence and pathogenesis (Risso, *et al.*, 2011).

In this review several gaps of knowledge have been outlined. The ranking of research priorities should take into consideration the following values: curative versus preventive relevance; public health relevance and impact on population health; size of population benefiting from research; poverty alleviation; feasibility (cost/benefit); equity implications; critical need; long term and hence sustainable benefit.

References

1. Anonymous, Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(Suppl.1):429-32.
2. Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodríguez M, Cardinal MV, *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. Int J Parasitol. 2010;40:1599-607.
3. D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, *et al.* Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. J Clin Microbiol. 2009;47:1718-25.
4. Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop. 2009;110:15-21.
5. Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Bargues MD. Genetic variability and phylogenetic relationships within *Trypanosoma cruzi* I isolated in Colombia based on miniexon gene sequences. J Parasitol. Res. 2009; 89:7364.
6. Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. Am J Trop Med Hyg. 2009;81:1041-9.

7. Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, *et al.* Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000410.
8. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, *et al.* A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitol.* 2009;136:641-55.
9. Miles MA, Llewellyn MD, Lewis M, Yeo R, Baleela S, Fitzpatrick MW, *et al.* The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitol.* 2009;136:1509-28.
10. Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R, Toyé PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 1978;272:819-21.
11. Risso MG, Sartor PA, Burgos JM, Briceño L, Rodríguez EM, Guhl F, *et al.* Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;84:78-84.
12. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;83:141-52.
13. Tibayrenc M, Ayala FJ. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomic and epidemiological significance. *Evolution.* 1988;42:277-92.
14. Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sanchez H, Adamson S, Miles GAJ, *et al.* . Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005;35:225-33.
15. Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, *et al.* Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Medecins Sans Frontieres. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e488.
16. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:1051-4.
17. Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, *et al.* Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *Int J Parasitol.* 1998;28:105-12.



Epidemiología molecular de la enfermedad de Chagas en el Gran Chaco americano

Patricio Diosque

Unidad de Epidemiología Molecular, Instituto de Patología Experimental-CONICET-
Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

El Gran Chaco americano es una ecorregión con una superficie de 1,3 millones de kilómetros cuadrados y se extiende sobre territorios de Argentina, Paraguay y Bolivia. La transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, continúa siendo un serio problema en esta región, la cual se ha transformado en un área prioritaria de lucha contra la transmisión vectorial del parásito.

En este contexto, la diversidad de *T. cruzi* representa un factor de importancia epidemiológica. La identificación de los diferentes linajes y genotipos *multiloci* del parásito mediante marcadores moleculares, permite abordar el estudio de la compleja dinámica de transmisión de *T. cruzi* en la región. De los seis linajes mayores de *T. cruzi* (TcI-TcVI), cinco de ellos están presentes en el Gran

Chaco (TcI, TcII, TcIII, TcV y TcVI).

Con el propósito de conocer la diversidad intralínea, hemos obtenido y examinado aislamientos y clones de *T. cruzi* provenientes de los ciclos doméstico y silvestre del Chaco argentino. Los aislamientos y clones fueron examinados mediante *Multilocus Enzyme Electrophoresis*, *Multilocus Sequence Typing*, *Random Amplified Polymorphic DNA*, *Multilocus Microsatellite Typing* y análisis de la región intergénica de miniexón. Hemos identificado los linajes TcI, TcIII, TcV y TcVI. El número de genotipos *multiloci* en cada linaje fue: 24 en TcI, 2 en TcIII, 4 en TcV y 8 en TcVI.

En el presente trabajo se discuten las implicancias de la importante diversidad observada así como también los alcances y las limitaciones de los diferentes marcadores examinados.



Avances en la epidemiología molecular de la toxoplasmosis en América

Claudia Patricia Herrera, Catalina Álvarez

Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes, Bogotá, D.C., Colombia

El protozoo *Toxoplasma gondii* es un parásito ampliamente distribuido en animales de sangre caliente y es una zoonosis en humanos (Dubey, 2010), en donde se comporta como protozoario intracelular obligado. Esta última característica define un comportamiento particular en el que se presenta una íntima interacción entre este el parásito y su huésped. La necesidad de este microorganismo de invadir una célula y de evadir el sistema inmune de su huésped, ha hecho que desarrolle una maquinaria de invasión casi única, que aumenta significativamente su eficiencia en el proceso infección de nuevos huéspedes (Laliberte y Carruthers, 2008).

Este parásito infecta un cuarto de la población mundial, sin embargo, la gran mayoría de las personas infectadas no presenta sintomatología. Sólo alrededor del 10% de los infectados desarrollan una lesión en retina (De la Torre, *et al.*, 2009). Los factores que determinan por qué unas personas desarrollan lesión ocular y otras no, no se conocen. Aunque pueden jugar un papel los factores genéticos, existe también información de que la diferencia entre las cepas de distinto origen geográfico podría jugar un papel en este desenlace (Ajzenberg, 2010a).

En Norteamérica y Europa, múltiples estudios *in vitro* han determinado que las cepas de toxoplasma poseen un comportamiento del tipo clonal y que bajo marcadores, como el gen *SAG2*, la gran mayoría de estas cepas pueden ser agrupadas en tres tipos de clones, llamados tipo I, II y III (Sibley, 2009). Estos linajes son 98% similares en el ADN y presentan patrones polimorfos bialélicos en virtualmente todos los *loci*, lo cual indica que surgieron a través de pequeñas recombinaciones en el medio silvestre seguido por expansión clonal en los últimos 10.000 años. A pesar de que las cepas de *T. gondii* son genéticamente muy similares, muestran fuertes diferencias fenotípicas en los ratones de laboratorio, que proporciona un modelo para la infección aguda y crónica. Las cepas tipo I se comportan uniformemente en todas las dosis letales (alta virulencia) en todos los cepas de ratones de laboratorio, mientras que los tipos II (virulencia intermedia) y III (de baja virulencia)

muestran niveles de capacidad patógena mucho más bajos (Benhke, *et al.*, 2011).

En algunas regiones de África, y especialmente en Suramérica, se ha logrado detectar una gran diversidad genética en las cepas aisladas, en las que se ha demostrado la presencia de grupos clonales atípicos (Ajzenberg, *et al.*, 2010a). Mediante marcadores *multiloci* (MLST), ha sido posible identificar diferentes poblaciones predominantes en Suramérica llamadas SA1 y SA2 que, en algunos casos, no se encuentran directamente relacionadas con los tres tipos clonales principales (Lehmann, *et al.*, 2006).

En Colombia, en muestras aisladas de seres humanos, cerdos, gatos y gallinas y utilizando como marcadores los genes *SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB* y *GRA6* se encontró que las cepas obtenidas presentaban una predominancia de alelos tipo I y II y en otros casos una recombinación entre alelos de cepas del tipo I, II y III (Herrera, *et al.*, 2005; Gallego, *et al.*, 2006). A nivel de capacidad patógena y virulencia en seres humanos, la clasificación propuesta de los tipos clonales no se ha reconfirmado, ya que no existen estudios que corroboren de manera contundente que existe una relación entre el tipo de cepa infectante y la sintomatología presente en pacientes. Esto se debe a que todas las caracterizaciones realizadas previamente en cepas de origen humano, no se han analizado directamente, sino que han pasado por diferentes procesos de mantenimiento como líneas celulares y pasajes en ratones en los que se hacen los estudios, lo cual no permite hacer una correlación entre la cepa aislada y la sintomatología del paciente. Además, algunos estudios se han realizado evaluando marcadores, que no han demostrado tener una relación directa con los factores de virulencia asociados a la patología (Gómez-Marín, 2009).

Los estudios recientes han centrado su atención en las proteínas que actúan como factores de virulencia en el proceso de invasión a la célula por parte de *T. gondii*. Mediante la infección artificial de fibroblastos humanos con cepas que diferían en su virulencia en ratones (tipo I, II y III) y posteriormente realizando cruces entre progenies

(F₁) de estas mismas cepas, dos grupos de investigación mapearon todos los *loci* del parásito que se encontraban relacionados con diferencias en la capacidad patógena basados en un análisis de expresión de genes.

Sus resultados demostraron que la virulencia en un huésped dado (ratones) se encuentra influenciada por el tipo de alelos que están presentes en, por lo menos, cinco *loci*, los dos *loci* que presentaron mayores cambios en procesos de infección fueron ROP16 y ROP18. ROP16 fue el *locus* que mostró ser el más importante, ya que en los cultivos de células humanas se observaron cambios en la activación de STAT3/6, producción de citocinas e IL-12, modulando así rutas de señalización que contienen procesos de fosforilación dentro del huésped, demostrando de esta forma una inmunomodulación por parte del parásito.

Este tipo de cambios dentro del proceso de respuesta del huésped frente al parásito podría resultar en diferencias en las patologías de la enfermedad (Boothroyd y Dubremetz, 2008). Este comportamiento ha sido evaluado *in vivo* en ratones en donde la ROP16 parece tener un rol muy importante en determinar los niveles en suero de IL-12 y, por tanto, determinar el curso general de la infección. El gen que codifica para ROP16 se encuentra en el ADN genómico, es una gen de copia única y está constituido por un solo exón que contiene un dominio S/T cinasa y un dominio NLS (Bradley y Sibley, 2007; Saeij, *et al.*, 2007)

Hasta hace poco la toxoplasmosis no era considerada una zoonosis vinculada al agua a pesar de que el agua se ha considerado como uno de los vehículos más comunes para la transmisión de este tipo de parásitos. Diferentes estudios han sugerido una posible asociación entre el consumo de agua, no tratada o sin filtrar, contaminada con ooquistes y la manifestación de la infección aguda. En marzo de 1995 se presentó en Canadá un brote de toxoplasmosis y se demostró una asociación estadísticamente significativa entre la adquisición de la infección aguda con *T. gondii* y la residencia en el área de un sistema de distribución de agua municipal. Probablemente nunca se compruebe definitivamente que el agua era la fuente del brote debido a que no fue posible recolectar parásitos de la reserva que alimentaba el sistema. Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que el sistema que distribuía agua clorada y sin filtrar estaba directamente relacionada con el brote (Jones y Dubey, 2010).

En América Latina, esta importante asociación sólo se ha estudiado en Brasil, en donde se

encontró que el hielo elaborado de forma casera representaba un posible factor de riesgo para contraer toxoplasmosis aunque no haya sido posible detectar el ADN de *T. gondii* en ninguna de las muestras de hielo analizadas. Aunque dichos resultados no descartan la posibilidad de que el agua utilizada haya estado contaminada, ponen en evidencia lo difícil que resulta la recolección e identificación de estos parásitos debido a que es necesario recolectar volúmenes significativos de muestra (Heukelbach, *et al.*, 2007). Otro estudio realizado en este país demostró que beber agua no filtrada aumenta el riesgo de seropositivos en personas de grupos socioeconómicos bajos.

A nivel de diagnóstico de esta parasitosis mediante herramientas moleculares, como la PCR en muestras clínicas, varios estudios recientes han demostrado que es posible obtener una mayor sensibilidad si se diseñan cebadores para secuencias cortas, ya que existe una mayor efectividad de amplificar un fragmento pequeño de ADN que de amplificar uno grande. Además, varios estudios hechos en individuos con toxoplasmosis ocular en Suramérica a partir de muestras de sangre periférica, han demostrado que esta metodología presenta buenos resultados de sensibilidad y especificidad (Ajzenberg, 2010b; Silveira, *et al.*, 2010)

Referencias

1. Ajzenberg D. Type I strains in human toxoplasmosis: myth or reality? *Future Microbiol.* 2010a; 5:841-3.
2. Ajzenberg D. Is PCR testing on blood samples useful or not in the diagnosis of *Toxoplasma* encephalitis? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010b;104:569-70.
3. Behnke M, Khana A, Wootton J, Dubey J, Tanga K, Sibley D. Virulence differences in *Toxoplasma* mediated by amplification of a family of polymorphic pseudokinases. *PNAS.* 2011. Disponible en: pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.
4. Boothroyd J, Dubremetz J. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6:79-88.
5. Bradley P, Sibley D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10:582-7.
6. De la Torre A, Ríos-Cadavid A, Cardozo C, Gómez-Marín JE. Frequency and factors associated with recurrences of ocular toxoplasmosis in a referral centre in Colombia. *J Ophthalmol.* 2009;8:1001.
7. Dubey JP. *Toxoplasmosis of animals and humans.* Boca Ratón, FL: CRC; 2010.
8. Gallego C, Saavedra-Matiz C, Gómez-Marín J. Direct genotyping of animal and human isolates of *Toxoplasma gondii* from Colombia (South America). *Acta Trop.* 2006;97:161-7.

9. Gómez-Marín JE. *Toxoplasma* strain nomenclature. *J Infect Dis.* 2009;200:1012.
10. Herrera C, Sánchez N, Hortúa A, Beltrán S, Contreras Y. Caracterización biológica y antigénica de cepas de *Toxoplasma gondii* aisladas de carnes de cerdo en un frigorífico de Bogotá. *Infectio.* 2005;9:131-8.
11. Heukelbach J, Meyer-Cirkel V, Moura R, Gomide M, Queiroz J, Saweljew P, Liesenfeld O. Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:287-9.
12. Jones J, Dubey J. Waterborne toxoplasmosis-recent developments. *Exp Parasitol.* 2010;124:10-25.
13. Laliberte J, Carruthers B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:1900-15.
14. Lehmann T, Marcet PL, Graham DH, Dahl ER, Dubey JP. From the cover: globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:11423-8.
15. Sibley D, Khan A, Ajioka J, Rosenthal B. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. *Phil Trans R Soc B.* 2009;364:2749-61.
16. Silveira C, Vallochi A, Rodrigues da Silva U, Muccioli C, Holland G, Nussenblatt R, Belfort R, Rizzo L. *Toxoplasma gondii* in the peripheral blood of patients with acute and chronic toxoplasmosis. *Br J Ophthalmol.* 2010. doi:10.1136/bjo.2008.148205.



***Trypanosoma cruzi* I en Colombia, diversidad genética y relevancia para la epidemiología de la enfermedad**

Omar Triana, Ana María Mejía

Grupo Biología y Control de Enfermedades Infecciosas, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, afecta a los humanos y a una gran variedad de mamíferos reservorios (1). Se estima que hay entre 7 y 8 millones de personas infectadas con el parásito, principalmente en regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica y Suramérica (2,3). En Colombia, *T. cruzi* se distribuye a lo largo del valle del río Magdalena, en la región del río Catatumbo, la costa del Caribe, la Sierra Nevada de Santa Marta, las estribaciones de los Llanos Orientales y la Serranía de la Macarena (4).

Trypanosoma cruzi es un organismo diploide de reproducción asexual que evolucionó mediante la propagación de linajes clonales, y donde las cepas que circulan son consideradas como unidades epidemiológicas, compuestas por uno o múltiples clones, que circulan entre insectos vectores y mamíferos reservorios. Esta compleja estructura de poblaciones de *T. cruzi* ha incitado grandes esfuerzos por encontrar marcadores bioquímicos y moleculares que permitan correlacionarla con características específicas de la relación vector-parásito-huésped. El uso de diferentes marcadores moleculares ha demostrado una alta heterogeneidad genética del parásito y la imposibilidad de establecer relaciones específicas con sus características biológicas.

Con el fin de esclarecer aun más estas relaciones y la estructura de las poblaciones de *T. cruzi*, recientemente se han utilizado diferentes técnicas para clasificar el parásito en diferentes unidades

discretas de tipificación (UTD). Así, se llegó a un consenso sobre la clasificación del *T. cruzi* en seis UTD llamados Tc I a Tc VI (5). En Colombia, diversos estudios han demostrado una alta variabilidad genética entre las poblaciones de *T. cruzi*, aisladas tanto de vectores como reservorios, incluido el humano (6-119). *Trypanosoma cruzi* I es el grupo predominante en el país, y está presente en los ciclos de transmisión doméstica y silvestre (12). Sin embargo, el grupo *T. cruzi* II también ha sido reportado en algunos vectores y, más recientemente, en la sangre de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica (13).

Durante los últimos años algunas investigaciones utilizando comparaciones de secuencias de la región intergénica de los genes miniexón, han propuesto la existencia de cuatro genotipos o haplotipos para Tc I que circulan en Colombia, los cuales pueden estar vinculados a los ciclos de transmisión del parásito (14-15). Así, los genotipos Ia y Ib se encuentran principalmente asociados a la infección doméstica y la presencia de *Rhodnius prolixus*; el genotipo Ic a ambientes peridomésticos, y el genotipo Id, a *Triatoma dimidiata* y ambientes selváticos.

A pesar de la predominancia de Tc I en Colombia, su presencia en otros países, como Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Venezuela, entre otros, ha sido también corroborada (16). Recientemente, la identificación de un genotipo le fue, además, reportada para países del sur de nuestro continente. Esta alta variabilidad genética

en *T. cruzi* I, hace cada vez más difícil relacionar al genotipo del parásito con las manifestaciones clínicas, aspectos epidemiológicos y diferencias en el comportamiento biológico, ampliamente conocido para las cepas circulantes.

Teniendo en cuenta la necesidad de utilizar otros marcadores genéticos más sensibles para genotipificar a las poblaciones de parásitos circulantes en diferentes huéspedes y regiones del país, con el conocimiento del genoma del parásito y, por ende, de las secuencias de sus genes, nuevos marcadores están surgiendo y, seguramente, en un par de años más se podrá dilucidar estos interrogantes.

En este sentido, la identificación y análisis de los polimorfismos de nucleótidos únicos (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) mediante la reacción en cadena de la polimerasa junto con el polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción (PCR-RFLP), se convierte en una herramienta valiosa para la clasificación de estos parásitos. Mediante esta metodología, se han identificado algunos SNP en algunos genes funcionales, como mucina, cruzipaina y tripanotión reductasa. El análisis de estos marcadores demuestra en Colombia la presencia de un genotipo con alta frecuencia, y del cual se derivan los otros genotipos que circulan en el país. Este genotipo está ampliamente distribuido y circula en varias especies de vectores y reservorios. Por otro lado, el análisis con estos marcadores también muestra la presencia de un segundo genotipo que difiere en tres pasos mutaciones del más frecuente, pero el cual está más limitado a la zona del Caribe colombiano.

Por otro lado, con un análisis de espectro de la diversidad genética y conglomerados (*clusters*) con los genotipos *multiloci* identificados, y asumiendo un modelo de mutación de paso a paso, se encontró que la distribución de las distancias obtenidas para todas las cepas analizadas indica la presencia de 18 genotipos diferentes pero con tres grandes grupos, los cuales son compatibles con los principales genotipos propuestos previamente para *T. cruzi* I en el país. Uno de los grupos se asoció principalmente al vector *R. prolixus*, como ya ha sido demostrado para el genotipo TcIa, mientras que otro se asoció a *T. dimidiata* en concordancia con el genotipo Id. Esto demuestra la capacidad de los SNP en los *loci* estudiados para clasificar y diferenciar las cepas de *T. cruzi*.

Por otra parte, una fuerte asociación entre las especies de *Rhodnius* y el grupo Tc I ha sido demostrada mediante infecciones artificiales,

donde las especies *R. prolixus*, *R. pallelescens* y *R. robustus* favorecen el crecimiento de TcI mientras que *T. dimidiata*, *T. infestans* y *P. geniculatus* favorece a *T. cruzi* II. Este resultado apoya la existencia de genotipos particulares de *T. cruzi* asociados a ciclos de transmisión y huéspedes y vectores particulares (12).

En conclusión, estos nuevos marcadores ofrecen un espectro de diversidad genética asociada principalmente a los ciclos de transmisión del parásito y, en parte, a la diferenciación geográfica, por lo que el polimorfismo en estos genes y el uso de una combinación de estos *loci* podrían ser útiles en estudios de epidemiología molecular con el objetivo de identificar los genotipos circulantes en los insectos vectores y la infección de diferentes huéspedes vertebrados.

Finalmente, la identificación de nuevos marcadores moleculares que permitan la identificación de genotipos de *T. cruzi* que circulan en las diferentes regiones sigue siendo una prioridad en los estudios epidemiológicos.

Referencias

1. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(Suppl.1):17-30.
2. Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:577-91.
3. WHO. Chagas disease: control and elimination. 124th Session, Executive Board EB124. Geneva: WHO; 2008.
4. Guhl F. Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana: situación actual en Colombia. Medicina. 2000;22.
5. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:1051-4.
6. Rodríguez P, Montilla M, Nicholls S, Zarante I, Puerta C. Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998;93:739-40.
7. Ruiz-García M, Montilla M, Nicholls SO, Angarita L, Álvarez D. Genetic relationships and spatial genetic structure among clonal stocks of *Trypanosoma cruzi* in Colombia. Heredity. 2000;85:318-27.
8. Cuervo P, Cupolillo E, Segura I, Saravia N, Fernandes O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the ribosomal DNA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:877-80.

9. Montilla MM, Guhl F, Jaramillo C, Nicholls S, Barnabe C, *et al.* Isoenzyme clustering of Trypanosomatidae Colombian populations. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66:394-400.
10. Salazar A, Schijman AG, Triana-Chávez O. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signatures. *Acta Trop.* 2006;100:110-8.
11. Triana O, Ortiz S, Dujardin JC, Solari A. *Trypanosoma cruzi*: variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis. *Exp Parasitol.* 2006;113:62-6.
12. Mejía-Jaramillo AM, Peña VH, Triana-Chávez O. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. *Exp Parasitol.* 2009;121:83-91.
13. Zafra G, Mantilla JC, Valadares HM, Macedo AM, González CI. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitol Res.* 2008;103:731-4.
14. Herrera C, Bargas MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007;7:535-9.
15. Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, *et al.* Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 2009;110:15-21.
16. Cura C, Mejía A, Duffy T, Burgos J, Rodriguero M, Cardinal M, *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite morif of the intergenic region spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol.* 2010;40:1599-607.



Molecular epidemiology and ecosystem approach of the reinfestation process by *Triatoma infestans* in rural communities of the Paraguayan Chaco

Antonieta Rojas de Arias¹, Miriam Rolón¹, María Celeste Vega¹, Ana Gómez¹, Fabiola Román¹, Humberto Sánchez¹, Cynthia Acosta¹, Cesia Villalba², Carla Cecere³, Paula Marcet⁴, Ellen Dotson⁴

¹ Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica, Asunción, Paraguay

² Programa Nacional de Control de la Enfermedad de Chagas, Asunción, Paraguay

³ Laboratorio de Eco-Epidemiología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

⁴ Entomology Branch-Division of Parasitic Disease-Center for Global Health, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA

Study area

Four villages belonging to the indigenous territory of the Central Chaco were surveyed from March 2008 to November 2009. Different ethnicities of indigenous peoples are the original inhabitants of this territory, which belongs to the driest portion of the Paraguayan Chaco. The base line survey carried out in 325 dwellings showed an indoor infestation rate with *Triatoma infestans* around 36% and a colonization index of 62.7%. Peridomestic house infestation was 37.5% (12/32) and all foci occurred in chicken coops. No *T. infestans* was collected in the peridomestic area.

Risks factor analysis for house infestation

Contrary to expectations, any risk factors were associated with *T. infestans* house infestation (table 1).

Spatial analysis of bug abundance

After the first insecticide spraying each house was reinspected for the presence of triatomine bugs in August 2008, and every three months afterward from November 2008 to November

2009. Among the 332 houses analyzed, 6.3% (61 houses) reached a significant range of aggregation (12,700-13,400 m), and all of them belonged to 12 de Junio. Eighty two percent of houses did not show local aggregation at any analyzed distance, which means they did not belong to any clusters.

The cumulative number of *T. infestans* per house after one year post-spraying in 12 de Junio and the location of the sylvatic foci and two suspected foci within of 12 de Junio, did not show any spatial relationship between the pattern of house reinfestation during the first year post-spraying and the location of two suspected sources and the nearest (430 m) sylvatic focus. In Campo largo, two significant focal clusters of the cumulative number of *T. infestans* after one year post-spraying were observed. Several infested houses were detected in the influence areas of these two focal clusters during the first year post spraying. The patterns of clustering in Campo Largo suggest a relationship between these two suspected foci and the distances from reinfested houses during the first year post-

Table 1. Factors associated with the occurrence of *Triatoma infestans* infestation at the baseline survey as determined by multiple logistic regression analysis.

Variable	Odds ratio	95% CI		p
Unplastered internal walls	1.06	0.41	2.73	0.90
Non-resistant house materials in all components	1.34	0.58	3.10	0.50
House >5 years	1.01	1.00	1.01	0.25
Number of rooms	1.04	0.94	1.15	0.41
Animals entering the house	0.60	0.18	2.03	0.41
Presence of animals	2.18	0.71	6.71	0.17

Table 2. Description of the suspected sources of reinfestation for Campo Largo considering the number of *Triatoma infestans* detected by standard method at baseline, and after 3 and 12 months post-spraying (mps), presence of adult insects (A) and nymphs (N), and infestation detected by traps at 3 months post-spraying.

Village	Suspected sources	No. of <i>T. infestans</i> (stage) *			Cumulative catch	<i>T. infestans</i> detected by traps**	Infestation per date of evaluation
		At baseline	At 3 mps	At 12 mps			
Campo Largo	2425	1 (A)	3 (N-A)	9 (N-A)	Positive	3, 6, 9 mps	
	2623	9 (A)	1 (A)	11 (N-A)	Positive	3, 6 mps	

* Number of *Triatoma infestans* per house detected by the standard method

** Infestation detected at 3 months post-spraying in domicile

spraying. Significant clustering distances around sylvatic foci and those from reinfested houses were also observed (table 2).

Trypanosoma cruzi infection and lineage identification

A total of 57 domestic *T. infestans* collected at the baseline survey that were microscopically positive for *Trypanosoma cruzi* were cultured, and 46 isolates were successfully obtained. Among reinfestant triatomines, 5 isolates were achieved. For identification of different *T. cruzi* lineages and sublineages, a combination of four PCR reactions was used: D7 of 24sRNA, 18SrRNA, miniexon and the reaction of the PCR-RFLP HSP60. Only TcII was isolated from *T. infestans* (TC2). A predominance of *T. cruzi* IId (TCV), identified in 23 *T. infestans*. Other 22 specimens of *T. infestans* had *T. cruzi* IIe (= TCVI). *T. cruzi* IIe (TCVI) predominated in 12 de Junio, whereas *T. cruzi* IId was the only one detected in Campo Alegre. It is important to note that besides 6 isolations of TC2d, TC2b (TCIV) was also isolated from a female *T. infestans* captured indoors in Campo Largo.

Bloodmeal patterns of *Triatoma infestans*

Of the 30 intestinal contents analyzed from sylvatic *T. infestans*, 4 samples were positive (13 %), 22 samples were not positive for any of the tested hosts (70%) and 5 samples (17%) were indefinite (low reaction in the ELISA test, not enough

to consider positive). The distribution of blood meal sources were humans (45 %), dog (33 %), cat (11 %) and goats (11%). In light of the results obtained to date, we can conclude that the process of reinfestation of houses by triatomines corresponds to a repopulation of insects that have stayed in the houses after the failure of the spray. Although we could not detect many of the bloodmeal sources for lack of antibodies of wild animals in the ELISA technique, some wild triatomines had human, dog, cat, and goat bloodmeals. The sociocultural behavior of indigenous populations during the preparation of charcoal may explain the bloodmeal sources of sylvatic insects, since villagers stay in the forest for long periods to prepare charcoal.

Morphobiometric analyses

Geometric morphometrics of wings did not find significant differences in wing size and shape among triatomines captured before and after insecticide spraying and the sylvatic ones. Because of the range of significant aggregation distances observed between sylvatic and domiciliary reinfestations, a hypothesis is that vectors could have moved out of houses during the spraying process in search of refuges within the sylvatic surroundings.

Genetic structuring of *Triatoma infestans* populations

In order to elucidate the origin of reinfesting

populations, the genetic diversity of *T. infestans* domestic populations collected before and after insecticide spraying was analyzed (ITS-2 and mt*CytB* gene sequences). Pre- and post-spraying populations from the same community were more related to each other than the other populations.

12 de Junio was selected for molecular analysis because there we collected the largest number of *T. infestans* at baseline, after interventions (reinfestations), and in sylvatic habitats. In 10 Leguas village no reinfesting triatomine was captured; in Campo Alegre no sylvatic triatomine was captured, and in Campo Largo sylvatic triatomines were recently found and will be the next community analyzed with the molecular markers. In total, 63 samples from 12 de Junio were processed, of which 20 individuals were captured at baseline, 21 were reinfesting individuals, and 22 were sylvatic individuals (data not shown).

For molecular analysis, genes *Cyt B* and *ITS2* and microsatellites were sequenced. We successfully obtained DNA from 63 samples, 25 were sequenced for the gene *Cyt B* and the results of the sequencing of *ITS2* and microsatellites were already sent to the laboratory for analysis. Of 25 samples sequenced for *CytB*, 8 corresponded to baseline (one sample must be repeated), 3 reinfesting, and 14 sylvatic individuals. The results of the sequencing of each individual were compared with the GenBank database, finding 3 different haplotypes. Eight samples were consistent with AY062165.1 and EF639038.1 haplotypes; and 16 samples corresponded with the new haplotype described for Paraguay (deposited in GenBank with the access code HQ848648) which we named haplotype XL. Therefore, we can infer that the reinfesting populations of 12 de Junio are genetically identical to the baseline population with the analysis of the *Cyt B* gene and sylvatic triatomines collected near this community also coincided genetically with these populations.

Conclusions

We have found for the first time sylvatic colonies of *T. infestans* in the Paraguayan Chaco region. It is not yet known how widespread these triatomines are: they have been captured at different distances from houses in the communities of 12 de Junio, 10 Leguas, and Campo Largo, in ranges from 274 m to over 3 km. The spatial analysis of the distribution and density of triatomines at baseline and their relation to the process of house reinfestation and the distribution of sylvatic triatomines allowed us to infer that in Campo Largo village, two clusters

explain the possible reinfestation process. The sylvatic clusters close to one of these houses could explain the peridomestic and domestic reinfestation of the house.

However, since we do not know if the sylvatic triatomines were there prior to insecticide spraying, one possibility is that these populations dispersed into the wild because of insecticide spraying, at least the bug populations closest to the community. For the rest of the communities, no significant aggregations were detected, and we can attribute reinfestations to flaws in insecticide spraying.

Regarding the source of house reinfestation, in light of the results obtained so far, we can infer that the reinfesting populations of 12 de Junio are genetically identical to the baseline population with the analysis of the *CytB* gene. Surprisingly, we also observed that sylvatic triatomines collected in the sylvatic habitats near the village also coincided genetically with these populations.

References

1. Buitrago R, Waleckx E, Bosseno MF, Zoveda F, Vidaurre P (2010) First report of widespread wild populations of *Triatoma infestans* (Reduviidae, Triatominae) in the valleys of La Paz, Bolivia. *Med Hyg* 82(4): 574-579.
2. Ceballos LA, Piccinali RV, Berkunsky L, Kitron U, Gurtler RE (2009) First finding of melanic sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) colonies in the Argentine Chaco. *J Med Entomol* 46(5): 1195-1202.
3. Giordano R., Cortez J.C., Paulk S. and Stevens L. (2005). Genetic diversity of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in Chuquisaca, Bolivia based on the mitochondrial cytochrome b gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100, (7), 753-60.
4. Lyman DF, Monteiro FA, Escalante AA, Cordon-Rosales C, Wesson DM et al. (1999) Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 60(3): 377-86.
5. Monteiro F.A., Perez R., Panzera F., Dujardin J.P., Galvao C., Rocha D., Noireau F., Schofield C. and Beard C.B. (1999). Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanostoma*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 229-38.
6. Monteiro F.A., Barrett T.V., Fitzpatrick S., Cordon-Rosales C., Feliciangeli D. and Beard C.B. (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Mol Ecol* 12, (4), 997-1006.
7. Piccinali, R.V., et al., Genetic variability, phylogenetic relationships and gene flow in *Triatoma infestans* dark morphs from the Argentinean Chaco. *Infect. Genet. Evol.* (2011), doi:10.1016/j.meegid.2011.02.013.

8. Quisberth, S., et al., "Andean" and "non-Andean" ITS-2 and mtCytB haplotypes of *Triatoma infestans* are observed in the Gran Chaco (Bolivia): Population genetics and the origin of reinfestation. *Infect. Genet. Evol.* (2011), doi:10.1016/j.meegid.2011.03.014
 9. Rolón M, Vega MC, Román F, Gómez A, Rojas de Arias A (2011) First Report of Colonies of Sylvatic *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in the Paraguayan Chaco, Using a Trained Dog. *PLoS Negl Trop Dis* 5(5): e1026. doi:10.1371/journal.pntd.0001026
- Financial support by International Development Research Centre (IDRC), WHO Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) and Centers for Disease Control and Prevention Trabajo presentado con el apoyo económico del CSIC (España), (proyecto I-Coop0080).



Simposio

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE ENFERMEDADES PARASITARIAS - II

Haplotipificación combinada de limneidos vectores de fascioliasis: evaluación y aplicabilidad de marcadores ribosómicos y mitocondriales

María Dolores Bargues

Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Valencia, España

Los moluscos de la familia Lymnaeidae tienen un gran interés aplicado debido a su papel en la transmisión de varias especies de trematodos de gran impacto, tanto médico como veterinario, tales como los fasciólidos (*Fasciola hepatica* y *F. gigantica*), esquistosomátidos de aves y mamíferos y equinostomátidos. Sin embargo, los conocimientos actuales sobre su genética, así como sobre sus relaciones parásito-vector, resultan ser totalmente insuficientes para los estudios epidemiológicos y de control de estas trematodiasis.

En los limneidos vectores de la fascioliasis, la gran variabilidad intraespecífica de la concha y la escasez de características de valor sistemático-taxonomico en la morfoanatomía interna, son un gran problema, por cuanto la clasificación de individuos se hace muy dificultosa y, a veces, imposible. Así, se confunden unas especies con otras, donde se cree tener una sola especie en realidad se tienen varias especies crípticas o gemelas, y otras veces donde se cree tener varias especies, en realidad se está manejando una sola pero con gran variabilidad intraespecífica (Bargues y Mas-Coma, 2005; Bargues, *et al.*, 2001, 2006, 2007). Todo ello se extrapola, además, al gran confusionismo taxonómico en el que se encuentra sumida esta familia de moluscos, con determinados especialistas que aceptan un solo género, *Lymnaea sensu lato*, y otros que aceptan un sinnúmero de géneros, sin contar ya el enorme listado de sinonimias en especies y géneros. Por lo tanto, es muy frecuente que los conocimientos sobre las especies de limneidos presentes en una zona de endemia sean erróneos.

Sin embargo, poder alcanzar una sistemática y taxonomía correctas y apropiadas, es imprescindible habida cuenta la trascendencia de conocer el molusco o moluscos huéspedes intermediarios para poder comprender los patrones

de transmisión y situaciones epidemiológicas de la fascioliasis en los distintos lugares. Los fasciólidos muestran una acentuada especificidad: *Fasciola hepatica* es transmitida por especies del género *Galba* y *Fossaria*, mientras que *F. gigantica* utiliza especies del género *Radix* (Bargues, *et al.*, 2001). La especificidad parece estar relacionada con los dos géneros que se muestran como los más antiguos y los análisis filogenéticos corroboran el origen del ancestro del género *Fasciola* relacionado con el origen de estos dos géneros de limneidos.

Diferentes especies de limneidos aparecen implicadas en los diferentes patrones epidemiológicos y de transmisión de la fascioliasis (Mas-Coma, *et al.*, 2005, 2009a). Uno de los principales problemas de esta enfermedad estriba precisamente en la complejidad de la transmisión y heterogeneidad epidemiológica de las zonas de endemia humana, además de los efectos evidentes del cambio climático en diferentes áreas (Mas-Coma, *et al.*, 2009b). Así, las grandes zonas focales de afección humana muestran patrones de transmisión y características epidemiológicas diferentes. Por ejemplo, en los países andinos este patrón está caracterizado por hiperendemias humanas con altas prevalencias e intensidades humanas a gran altitud que comprenden dos subpatrones (Mas-Coma, *et al.*, 2005): (i) el subpatrón "altiplano", caracterizado por transmisión durante todo el año (Mas-Coma, *et al.*, 1999; Esteban, *et al.*, 2002), y (ii) el subpatrón "valle", caracterizado por transmisión estacional (Apt, *et al.*, 1993; Claxton, *et al.*, 1997; Espinoza, *et al.*, 2007).

La utilización de unos marcadores moleculares bien seleccionados permite establecer, mediante "haplotipificación multigénica combinada", qué cepas de los caracoles transmisores son las causantes de cada patrón de transmisión y cada

situación epidemiológica singular (Bargues y Mas-Coma, 2005). En el caso de los Lymnaeidae, los marcadores utilizados han sido los dos ITS del ADNr para clasificación sistemática de especies, subespecies y poblaciones, el gen *18S* ARNr para taxonomía molecular supraespecífica (Bargues y Mas-Coma, 1997) y un fragmento de la *cox1* y del gen *16S* ribosómico del ADNmt para la obtención de información sobre vías de expansión geográfica.

El análisis combinado de las secuencias de estos marcadores en limneidos procedentes de diferentes poblaciones y de diferentes países de Europa, América y África, nos ha permitido evaluar por primera vez su aplicabilidad en limneidos. Hemos comprobado cómo la haplotipificación combinada y las reconstrucciones filogenéticas de caracoles de las localidades tipo, pueden solucionar problemas de clasificación y constituyen unas herramientas muy útiles para la revisión sistemática de esta familia y para la comprensión de la transmisión, características epidemiológicas y capacidad de dispersión de una enfermedad emergente/reemergente, tal como es la fascioliasis (Mas-Coma, *et al.*, 2005).

En Norteamérica, Centroamérica y Suramérica hemos establecido el haplotipo de numerosos especímenes de limneidos, que representan diferentes especies e incluyen casi todos los diferentes países. Al igual que en Europa, los resultados han sido sorprendentes, e indican la necesidad de una reclasificación sistemática de los miembros americanos de esta familia de gasterópodos con base en secuencias de ADN. Entre los diferentes grupos estudiados, sorprenden los resultados del grupo *Galba/Fossaria*, que incluye importantes vectores de *F. hepatica* y en el cual recientemente se han descrito cuatro especies válidas (Bargues, *et al.*, 2007; Mera y Sierra, *et al.*, 2009). Entre los países estudiados, en Bolivia, la clasificación de los limneidos presentes en la zona de hiperendemia de fascioliasis humana del altiplano norte boliviano siempre se había atribuido a dos especies, *L. viatrix* y *L. cubensis*, y el establecimiento del haplotipo molecular nos permitió confirmar que, en realidad, no se trataba de ninguna de estas dos especies, sino de una amplia variabilidad intraespecífica de una única especie, *G. truncatula*, importada desde Europa (Mas-Coma, *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos solucionan un embotellamiento en la investigación en fascioliasis, por cuanto nos ha permitido:

- i) definir las especies de limneidos involucrados en la transmisión;

- ii) clarificar la distribución geográfica de los vectores para entender la epidemiología, la transmisión y la dispersión de la fascioliasis, y
- iii) caracterizar genéticamente los limneidos para estudios de sensibilidad fasciólidos/limneidos.

Las proporciones evolutivas obtenidas para cada marcador, corroboran la utilidad de los ITS para niveles específicos y supraespecíficos y del *18S* para taxones superiores. Los marcadores mitocondriales son adecuados para estudios de población y subespecíficos. Los resultados de estas investigaciones tienen especial importancia en las áreas endémicas de fascioliasis humana, ya que únicamente contando con un sistema taxonómico natural de sus vectores se podrá tener la base imprescindible para los estudios de epidemiología, transmisión, prevención y control de la fascioliasis.

Estudios financiados por los proyectos: SAF2010-20805, del Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España; RLA/5/049, de la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA), Viena, Austria; A/023213/09, de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) e ISCIII-RETIC RD06/0021/0017 del Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid, España.

Referencias

1. Apt W, Aguilera X, Vega F, Alcaino H, Zulantay I, Apt P, *et al.* Prevalencia de fascioliasis en humanos, caballos, cerdos y conejos silvestres en tres provincias de Chile. Bol Of Sanit Panam. 1993;115:405-14.
2. Bargues MD, Artigas P, Jackiewicz M, Pointier JP, Mas-Coma S. Ribosomal DNA ITS-1 sequence analysis of European stagnicoline Lymnaeidae (Gastropoda). Helvia München. 2006;6:29-40.
3. Bargues MD, Artigas P, Mera y Sierra RL, Pointier JP, Mas-Coma S. Characterisation of *Lymnaea cubensis*, *L. viatrix* and *L. neotropica* n. sp., the main vectors of *Fasciola hepatica* in Latin America, by analysis of their ribosomal and mitochondrial DNA. Ann Trop Med Parasitol. 2007;101:621-41.
4. Bargues MD, Mas-Coma S. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. Mol Biol Evol. 1997;14:569-77.
5. Bargues MD, Mas-Coma S. Reviewing lymnaeid vectors of fascioliasis by ribosomal DNA sequence analyses. J Helminthol. 2005;79:257-67.
6. Bargues MD, Vigo M, Horak P, Dvorak J, Patzner RA, *et al.* European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. Infec Genet Evol. 2001;1:85-107.

7. Claxton JR, Zambrano H, Ortiz P, Amoros C, Delgado E, Escurra E, *et al.* The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Perú. *Parasitol Int.* 1997;46:281-8.
8. Espinoza JR, Maco V, Marcos L, Saez S, González C, Neyra V, *et al.* Evaluation of Fas2-ELISA for the serological detection of *Fasciola hepatica* infection in humans. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;76:977-82.
9. Esteban JG, González C, Bargues MD, Angles R, Sánchez C, *et al.* High fascioliasis infection in children linked to a man-made irrigation zone in Perú. *Trop Med Int Health.* 2002;7:339-48.
10. Mas-Coma S, Angles R, Esteban JG, Bargues MD, Buchon P, Franken M, *et al.* The Northern Bolivian Altiplano: A region highly endemic for human fascioliasis. *Trop Med Int Health.* 1999;4:454-67.
11. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol.* 2005;35:1255-78.
12. Mas-Coma S, Funatsu IR, Bargues MD. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology.* 2001;123:S115-27.
13. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Vet Parasitol.* 2009b;163:264-80.
14. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv Parasitol.* 2009a;69:41-146.
15. Mera y Sierra R, Artigas P, Cuervo P, Deis E, Sidoti L, Mas-Coma S, Bargues MD. Fascioliasis transmission by *Lymnaea neotropica* confirmed by nuclear rDNA and mtDNA sequencing in Argentina. *Vet Parasitol.* 2009;166:73-9.



¿Cómo entender el flujo genético en poblaciones de *Trypanosoma cruzi*?, una mirada hacia la dinámica de transmisión y dispersión de linajes genéticos

Juan David Ramírez

Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Universidad de los Andes,
Bogotá. D.C., Colombia

La enfermedad de Chagas causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* es una antropozoonosis endémica del continente americano que afecta a más de 10 millones de personas (OMS, 2007). Este parásito puede ser transmitido mediante insectos vectores de la familia Reduviidae, transfusiones de sangre, por vía congénita u oral y por accidentes de laboratorio.

Trypanosoma cruzi se caracteriza por presentar una gran variabilidad genética reflejada en seis (TcI-TcVI) unidades discretas de tipificación (*Discrete Typing Units*, DTU) (Zingales, *et al.*, 2009). Estas unidades están distribuidas en todo el continente, con presencia de unidades discretas de tipificación en ciertas regiones geográficas. *Trypanosoma cruzi* I (TcI) se asocia con los ciclos doméstico y silvestre; *T. cruzi* II (TcII), con el ciclo doméstico; *T. cruzi* III (TcIII), con el ciclo selvático; *T. cruzi* IV (TcIV), con el ciclo doméstico y silvestre, y *T. cruzi* V y VI (TcV y TcVI), con el ciclo doméstico.

Muchos autores han establecido que el taxón *T. cruzi* presenta una estructura y propagación por clones (Tibayrenc, 1989), mientras que otros autores reportan una estructura sexual con eventos de recombinación demostrados *in vitro* (Gaunt, *et al.*, 2002). De igual manera, TcI y TcII se consideran como DTU parentales y con un patrón

de evolución independiente; TcIII y TcIV, como productos de los eventos de recombinación entre TcI y TcII, y TcV/TcVI, como productos de eventos de recombinación entre TcII y TcIII/TcIV (Sturm, *et al.*, 2003; Westenberger, *et al.*, 2002).

Los ciclos de transmisión juegan un papel importante en el patrón de diversificación del taxón *T. cruzi*. En TcI se han reportado genotipos que muestran la gran variabilidad intraespecífica de esta unidad discreta de tipificación. Se determinaron cinco genotipos asociados a los ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas (TcIa-TcIe) con base en polimorfismos de la región intergénica del gen miniexón (Herrera, *et al.*, 2007; Cura, *et al.*, 2010); asimismo, subgrupos en Chile y genotipos en Colombia, utilizando secuencias del gen citocromo b (*Cytb*) (Spotorno, *et al.*, 2008; Ramírez, *et al.*, 2011), asociados también a los ciclos de transmisión. De esta manera, se puede observar la importancia epidemiológica de los ciclos de transmisión en la diversificación intraespecífica e interespecífica en *T. cruzi*.

El ciclo silvestre de transmisión juega un papel especial para la diversificación de *T. cruzi*. Más de 100 especies distintas de reservorios mamíferos y más de 50 especies de triatomíneos que pueden albergar al parásito, muestran el estado basal de

diversificación de este taxón. Recientes trabajos han mostrado un patrón de selección que se diversifica en poblaciones multiclonales de TcI (Llewellyn, *et al.*, 2011). En principio se demostró que las poblaciones de TcI estaban asociadas a reservorios arbóreos y, las poblaciones de TcIII/TcIV, a reservorios terrestres, en especial TcIII a *Dasytus* spp. (Yeo, *et al.*, 2005); luego, utilizando secuencias de los genes *Cytb*, *ITS* y *SSU ADNr*, se corroboró que estas asociaciones no eran absolutas y se encontraron ciertos reservorios terrestres, como *Monodelphis brevicaudata* y *Philander frenata*, infectados con TcI (Marcili, *et al.*, 2009).

La pregunta yace en cuáles son los mecanismos de diversificación de *T. cruzi* en el ambiente selvático. Muchos autores han reportado la estructura y propagación por clones de este parásito, pero si esto es así, ¿en qué momento de la historia evolutiva de *T. cruzi* surgieron genotipos clonales diferentes entre sí dentro de un mismo huésped? Es probable que el flujo genético en el ambiente selvático pueda estar determinado por los diferentes huéspedes que estén causando una presión de selección que desconocemos sobre las poblaciones naturales de *T. cruzi*, lo cual sugiere la emergencia de genotipos clonales distintos.

Otros autores han demostrado los eventos de recombinación de poblaciones de *T. cruzi* y la existencia de las unidades discretas de tipificación híbridas TcIII-TcVI corrobora la evidencia de recombinación. Las poblaciones basales de *T. cruzi* existen en el ambiente selvático en un ciclo zoonótico, en el cual se pensaría que el entrecruzamiento llevaría a que su estructura genética fuese homogénea, pero, curiosamente, las poblaciones selváticas de *T. cruzi* poseen los mayores índices de diversidad genética.

Esta pregunta se ha resuelto usando marcadores microsatélites en poblaciones selváticas de todo el continente americano las cuales los valores de *F_{is}* son bajos y los niveles de heterocigocidad observada son altos, lo que sugiere que, a pesar de que *T. cruzi* sea un organismo clonal en el que se esperaría un posible efecto Wahlund por déficit de heterocigocidad, no se cumplen esas premisas; además, la existencia de híbridos como TcIII/TcIV en poblaciones selváticas refuerza el dogma de la caocidad de clones en *T. cruzi* y demuestra un aumento significativo en la heterocigocidad de las poblaciones selváticas de *T. cruzi* (Llewellyn, *et al.*, 2009; Oliveira, *et al.*, 1996; Ocaña-Mayorga, *et al.*, 2010; Lewis, *et al.*, 2010; Miles, *et al.*, 2009; Westenberger, *et al.*, 2005).

Trypanosoma cruzi aparece en el ambiente doméstico hace, aproximadamente, 15.000 años, cuando la colonización humana interrumpe su ciclo natural y enzoótico y se produce una antroponosis. Asimismo sucede con la dispersión de poblaciones naturales selváticas hacia los asentamientos humanos y la domiciliación de los insectos vectores selváticos infectados naturalmente con el parásito. Esto crea un modo de evolución e interacción, independiente pero no homogéneo. Los eventos de transmisión por contaminación y el flujo genético entre las poblaciones selváticas y domésticas, juegan un papel importante en la diversificación de *T. cruzi*; lo mismo sucede con la dinámica de transmisión de ciertas unidades discretas de tipificación.

En un principio se pensaba que TcI era una unidad discreta de tipificación asociada únicamente al ciclo selvático, lo cual se ha refutado con los reportes de pacientes infectados con TcI en Colombia y Argentina. Los análisis de biopsias cardíacas en pacientes chagásicos crónicos de Argentina, demostraron que aquéllos con cardiopatías graves estaban infectados con TcI; también se observó un patrón de histiotropismo, pues en biopsias cardíacas se encontró el genotipo TcIa y, en el torrente sanguíneo, el TcId.

El genotipo TcIa se ha asociado con infecciones humanas y el ambiente doméstico, usando la región intergénica del gen *miniexón*, el cual es el mismo genotipo A basado en el gen citocromo b y el grupo VEN_{dom} con marcadores microsatélites (Herrera, *et al.*, 2007; Ramírez, *et al.*, 2011; Llewellyn, *et al.*, 2009). Esto corrobora que el ambiente doméstico en el caso de TcI posee un patrón de evolución y dispersión especial, lo cual también se ha corroborado con la hipótesis de dispersión doméstica en Ecuador (Ocaña-Mayorga, *et al.*, 2011).

En Colombia, se hizo la genotipificación en pacientes chagásicos crónicos y se encontraron infecciones mixtas TcI/TcII, TcI/TcIII y TcI/TcIV, y una mayor frecuencia de TcId, lo cual corrobora que es crucial conocer el flujo genético entre las poblaciones selváticas y domésticas (Ramírez, *et al.*, 2010). Los análisis de clones TcI de Colombia han corroborado el patrón de aparición genotípica de TcIa mediante marcadores microsatélites y genes de maxicículo (Ramírez, *et al.*, 2011b, en preparación), mostrando la importancia de la dinámica de transmisión en la diversificación de *T. cruzi* y cómo éste es un mecanismo importante en la dispersión de linajes genéticos. El surgimiento

ha sido reportada en *T. cruzi* después de la eliminación vectorial de *Triatoma infestans* en el Cono Sur, donde los genotipos principales eran TcV y TcVI, pero luego de esto, poblaciones selváticas de *T. infestans* infectadas con TcIII y TcIV están colonizando el ambiente doméstico como genotipos emergentes (Llewellyn, *et al.*, 2009b).

En conclusión, es necesario conocer más a fondo el flujo genético entre las poblaciones selváticas y domésticas de *T. cruzi*, y conocer de mejor manera el patrón de diversificación en términos filodinámicos. El poder eliminar este flujo podría ser una clave para evitar la diversificación de este parásito y, de esta manera, sería posible mitigar el pleomorfismo de la sintomatología y la respuesta humoral; además, se podrían plantear estrategias de control de la enfermedad de Chagas y, así, mitigar un poco esta antropozoonosis que causa tantas muertes al año en Latinoamérica.

Por último, es necesario trabajar conociendo más en detalle la presencia y dispersión de los linajes genéticos asociados al ambiente doméstico, los cuales están causando las formas clínicas más graves. En este aspecto la epidemiología molecular se convierte en una herramienta primordial con el fin de conocer y dilucidar la estructura genética, sea clonal o sexual, de *T. cruzi* en países endémicos para esta enfermedad.

Referencias

- Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, *et al.* 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010;51:485-95.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, *et al.* Mechanisms of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature.* 2003;421:936-9.
- Guhl F, Ramírez JD. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop.* 2011;119:1-4.
- Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007;7:535-9.
- Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, *et al.* Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000410.
- Ocaña-Mayorga S, Llewellyn MS, Costales JA, Miles MA, Grijalva MJ. Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Southern Ecuador. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e915.
- Ramírez JD, Duque MC, Guhl F. Phylogenetic reconstruction based on cCytochrome b (Cytb) gene sequences reveals distinct genotypes within Colombian *Trypanosoma cruzi* I populations. *Acta Trop.* 2011;119:61-3.
- Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo C. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:899.
- World Health Organization, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Report of scientific group in Chagas disease. Buenos Aires, Argentina, April 17-20, 2005. Update, July 2007.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intra-specific nomenclature: second Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:1051-4.



***Trypanosoma cruzi* I: ¿es necesario establecer subdivisiones genéticas?**

Felipe Guhl, Juan D. Ramírez, Claudia Herrera

Universidad de los Andes, Centro de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Tropical, Bogotá. D.C., Colombia

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una entidad parasitaria crónica y sistémica, endémica de América, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Se estima que afecta, aproximadamente, a 15 millones de individuos y 21 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección. En América, se calcula una incidencia de 41.200 nuevos casos y un promedio de 12.500 muertes anuales (WHO, 2007). El agente etiológico

T. cruzi ha mostrado tener una gran variabilidad genética, lo que se evidencia en subdivisiones o unidades discretas de tipificación (Zingales, *et al.*, 2009; Brisse, *et al.*, 2000; Campbell, *et al.*, 2002). Actualmente, se conocen seis unidades discretas de tipificación (TcI-TcVI) distribuidas en todo el continente americano, con distribuciones geográficas específicas para algunas de ellas (Lewis, *et al.*, 2010; Miles, *et al.*, 2009).

En Colombia, las principales unidades discretas de tipificación que se han encontrado en humanos, vectores y reservorios, han sido en su mayoría TcI y, en bajas proporciones, TcII (Mejía-Jaramillo, *et al.*, 2009; Zafra, *et al.*, 2008; Ramírez, *et al.*, 2010). Muchos estudios con diversos marcadores moleculares, han demostrado la gran diversidad genética de TcI (Cura, *et al.*, 2010; Herrera, *et al.*, 2007; Herrera, *et al.*, 2009; Falla, *et al.*, 2009; Guhl y Ramírez, 2011; Llewellyn, *et al.*, 2009; Ocaña, *et al.*, 2009; Ramírez, *et al.*, 2011). Utilizando la región intergénica del gen miniexón (SL-IR), se han reportado cinco genotipos relacionados con los ciclos de transmisión de la enfermedad de Chagas distribuidos en todo el continente americano (Cura, *et al.*, 2009; Herrera, *et al.*, 2009); asimismo, utilizando marcadores microsatélite se han corroborado dos de estos genotipos (Llewellyn, *et al.*, 2009; Ocaña, *et al.*, 2010); de igual manera, utilizando la región codificante del gen citocromo B se han reportado dos subgrupos en Chile y cuatro genotipos en Colombia (Spotorno, *et al.*, 2008; Ramírez, *et al.*, 2011), lo que sugiere una gran variabilidad intraespecífica en este grupo.

A pesar de que la mayoría de los marcadores utilizados han sido regiones no codificantes del genoma del parásito, lo cual demuestra que estos análisis se han basado en posibles variaciones neutrales, se sugiere la necesidad de evaluar regiones codificantes para observar las implicaciones reales de la variabilidad de TcI. Las implicaciones de la variabilidad genética de TcI se han demostrado recientemente en las manifestaciones clínicas y el desarrollo de cardiomiopatías, en Argentina y Colombia (Burgos, *et al.*, 2010; Ramírez, *et al.*, 2010; Zafra, *et al.*, 2011), así como la diferencia de la respuesta humoral en pacientes crónicos (dos Santos, *et al.*, 2010; Macedo, *et al.*, 2010; Ramírez, *et al.*, 2009). Esto sugiere la necesidad de conocer más a fondo los determinantes genéticos de TcI, usando regiones codificantes y que estén implicadas en la capacidad infecciosa y en la virulencia del parásito.

Es importante mencionar que todos los estudios en que se ha intentado descifrar la variabilidad genética de TcI, se han basado en regiones no codificantes, como la región intergénica del gen miniexón, marcadores microsatélite, regiones repetitivas del ADNk e *Internal Transcribed Spacers* (Cuervo, *et al.*, 2008; Cura, *et al.*, 2010; Herrera, *et al.*, 2007; Herrera, *et al.*, 2009; Llewellyn, *et al.*, 2009; Ocaña-Mayorga, *et al.*, 2010; Triana, *et al.*, 2006).

La variabilidad genética de TcI ha sido muy importante recientemente, debido a la implicación de esta unidad discreta de tipificación en las formas clínicas de la enfermedad de Chagas (Burgos, *et al.*, 2010; Mantilla, *et al.*, 2010; Ramírez, *et al.*, 2010; Zafra, *et al.*, 2010), como también el papel de selección que diversifica los reservorios en esta unidad discreta de tipificación, lo cual puede ser una explicación de la gran variabilidad genética encontrada, tanto en regiones no codificantes como en regiones codificantes (Llewellyn, *et al.*, 2011).

Referencias

1. Brisse S, Henriksson J, Barnabe C, Douzery EJP, Berkyens D, Serrano M, *et al.* Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect Genet Evol.* 2003;2:173-83.
2. Burgos M, Altchek J, Bisio M, Duffy T, Valadares ME, Seidenstein RP, *et al.* Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2007;37:1319-27.
3. Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced leader genes. *Int J Parasitol.* 2010;40:1599-607.
4. Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 2009;110:15-21.
5. Guhl F, Pinto N, Aguilera G. Distribución y ecoepidemiología de los triatominos vectores de la enfermedad de Chagas en Colombia. *Biomédica.* 2005;25:76-9.
6. Herrera C, Bargues MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007;7:535-9.
7. Herrera C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, *et al.* Genetic variability and phylogenetic relationships within *Trypanosoma cruzi* I isolated in Colombia based on miniexon gene sequences. *J Parasitol Res.*
8. Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Miles MA. Experimental and natural recombination in *Trypanosoma cruzi*. *Am Trypano.* 2010;459-74.
9. Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, *et al.* Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000410.
10. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, *et al.* The molecular

- epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: Looking back and to the future. *Parasitol.* 2009;136:1509-28.
11. Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marín-Neto JA, Morillo C. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e899.
 12. Rassi A Jr, Rassi A, Marín-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 2010;375:1388-402.
 13. Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.* 2003;33:269-79.
 14. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104:1051-4.



Distribución de *Toxoplasma gondii* en México: prevalencia y genotipos en seres humanos y animales

María Dolores Correa, Heriberto Caballero-Ortega, Luz Belinda Ortiz-Alegría, Carlos Cedillo-Peláez, Alejandro Besné-Mérida, José Antonio Vargas-Villavicencio, Claudia Patricia Rico-Torres, Sandra Murrieta, José Luis Hernández-Islas, Irma Cañedo-Solares, Héctor Luna-Pastén

Laboratorio de Inmunología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud, México, D.F., México

Toxoplasma gondii es la causa de la parasitosis más ampliamente distribuida en el mundo, aunque es menos frecuente en las zonas frías o altas que en las templadas, cálidas y bajas (1). Su amplia distribución se debe a las múltiples posibilidades de transmisión, por contacto con agua o tierra contaminadas con ooquistes o por consumo de carne infectada con quistes tisulares. En zonas de gran contaminación con ooquistes, se observa una prevalencia alta y exposición a temprana edad. En otras partes, el riesgo principal es la carne cruda de cualquier especie, que, generalmente, se asocia a una prevalencia más baja y a una exposición más tardía.

Toxoplasma gondii se reportó en México desde la década de los 50, aunque realmente ha habido poca investigación sobre su frecuencia. En el cuadro 1 se resumen los resultados en seres humanos, algunos de ellos reportados por nosotros (2-4). Como puede observarse, los primeros trabajos referían resultados positivos en 48 a 51 % de las pruebas en población abierta en la zona tropical del golfo de México y de 15 % en la ciudad de México, de clima templado. Con pruebas serológicas para anticuerpos totales o de clase IgG, los valores obtenidos para individuos sanos, donadores de sangre o mujeres embarazadas varían ampliamente entre estados como Durango (7,4 a 8,9 %) y regiones cálidas y húmedas, como Yucatán (69 %) o Morelos (75 a 83 %). De especial relevancia es el aparente aumento de la toxoplasmosis humana en muestreos representativos de todo el país, pues cambió de 29 %, en 1953, y de 19 a 32 %, en 1987, a 42 a 62 % en un estudio reciente en el que

usamos los sueros de las Encuestas Nacionales de Salud de 2000 y 2006 (Caballero-Ortega *et al.*, enviado para publicación).

También, se observó un cambio en la distribución por región, así como un aumento significativo de la prevalencia en los niños. En los años 2000 se encontró una frecuencia alta de infección congénita en la ciudad de México mediante tamización neonatal (dos de cada mil recién nacidos vivos) y, de infección en mujeres embarazadas, en Jojutla, Morelos (IgG \geq 75 %)(Cañedo-Solares, *et al.*, enviado para publicación). En este último, los factores de riesgo se asociaron negativamente con la presencia de anticuerpos IgM, lo que sugería una transmisión alta en edades tempranas, fenómeno que fue reforzado por el hecho de que un niño de dos años de esta comunidad presentó infección adquirida posnatalmente.

Los estudios de toxoplasmosis en animales de México han aumentado, a partir de la década de los 90 (5-9). Al igual que para la infección en humanos, la distribución depende de la región más que de la especie estudiada, variando de menos de 20 % en zonas templadas altas, a más de 75 % en zonas tropicales bajas, como una región cercana al golfo de México, donde demostramos una seroconversión de 2,1 % anual en ovinos. En Colima (costa del Pacífico), se encontró una frecuencia significativamente más baja en borregos que viven en zonas de mayor altitud (más templadas) que en aquellos criados a menos 500 msnm. Además del clima, hemos encontrado los factores de riesgo descritos en la literatura científica, como la edad, la alimentación con desechos de carne en gatos

Cuadro 1. Datos de la frecuencia de toxoplasmosis en diversos grupos humanos en México*.

Tipo de población	Sitio (tipo de población)	Año de muestreo	Prevalencia/ frecuencia (%)	Técnica	
Población abierta	Tamaulipas	1951-1953	48	Toxoplasmina (intradermorreacción)	
	Veracruz		51		
	Distrito Federal		15		
	Oaxaca (rural)	1991	3,8	Hemaglutinación indirecta (totales)	
	Oaxaca (urbana)		25,5		
	Nacional		1962	28,9	Sabin y Feldman (totales)
			1953-1965	30	Inmunofluorescencia (IgG)
1987 (ENSA)**			19,0 - 30,0		
2000/2006 (ENSAs)£			42,0-62,0	ELISA (IgG)	
Durango		2011	6,1	ELISA (IgG)	
			2,1	ELISA (IgM)	
Controles o adultos "sanos"	Yucatán	1998	69	ELISA (IgG)	
	Durango	2007	8,9 2,3	ELISA (IgG) ELISA (IgM)	
Donadores de sangre	Jalisco	2005	20	Inmunofluorescencia (IgG)	
	Durango	2007	7,4 1,9	ELISA (IgG) ELISA (IgM)	
Niños, hospital de tercer nivel	Distrito Federal	1971-1996	0,1	Series de autopsias	
		1976	0,6		
		1962- 1982	12		
Adultos, hospital general Adultos, hospital de tercer nivel	Distrito Federal	1990	30		
		1990	8		
Mujeres embarazadas (totales)	Distrito Federal	1964	34	Sabin y Feldman	
		1965	18,0 - 23,0		
	Jalisco	1995	20	Inmunofluorescencia (IgG)	
	Morelos	2004	78,0-82,0 £	ELISA (IgG)	
		Durango	2005		6,1
	Morelos	2004	10,2 £	ELISA (IgM)	
Durango		2006	0		
Recién nacidos vivos	Distrito Federal	1962	1,8	Sabin y Feldman (totales)^	
		2004	0,2	ELISA (IgM)€	

* Tomados de la citas 2 a la 8

** ENSA: Encuesta Nacional Sero-Epidemiológica

^ La mayoría de estos casos son debidos a transmisión de anticuerpos maternos, no a infección congénita.

€ Casos confirmados por más de dos criterios y seguidos clínicamente

£ Trabajos sometidos a publicación

o acceso a ellos, del Distrito Federal y Colima, y el grado de tecnificación de las granjas de crianza de conejos.

Los estudios de genotipificación de *T. gondii* son aún más escasos, habiendo cuatro referencias en la literatura científica en las que se describen el genotipo I en monos ardilla y el genotipo III en gallinas de traspatio del valle de México, así como los mismos genotipos más recombinantes y atípicos, en muestras de perros y gatos ferales y de palomas del estado de Durango (10-13). También hemos encontrado las variantes I y III en gatos de Colima y el Distrito Federal, y de tipo I en un becerro de Hidalgo. Cabe resaltar que un perro tenía dos cepas, de tipo I y recombinante, que fueron accidentalmente separadas al inocular dos ratones distintos. Respecto a casos humanos, las variantes encontradas en cuatro pacientes con infección perinatal del valle de México y de Hidalgo, han mostrado alelos para el tipo I, si bien algunas tienen polimorfismos únicos (Rico-Torres *et al.*, enviado para publicación). De éstas, tres ocasionaron infección congénita con sintomatología y una sólo fue detectada en la sangre de la madre.

Los resultados descritos sugieren que la frecuencia de la toxoplasmosis en humanos y animales ha aumentado en México, en los últimos años. La redistribución geográfica y el incremento en edades tempranas, sugieren que esto se debe, principalmente, a un aumento en la contaminación ambiental por ooquistes. Es posible que el cambio climático haya tenido un efecto sobre este fenómeno. La predominancia de cepas de tipo I es similar a lo hallado en España, país que probablemente trajo la toxoplasmosis a México; sin embargo, estamos analizando los casos humanos o animales de zonas de tropicales de país, donde se espera una mayor variabilidad genética, por la mayor diversidad biológica y dispersión parasitaria.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el proyecto 86490-CONACyT, México.

Referencias

- Dubey JP. Toxoplasmosis -a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 2004;126:57-72.
- Correa D, Uribe-Salas FJ, Caballero-Ortega H, Vargas-Villavicencio JA, Cañedo-Solares I, Ortiz-Alegria LB, *et al.* Antecedentes del Proyecto: "Cambios en la seroprevalencia y distribución nacional de la toxoplasmosis entre 2000 y 2006: análisis de las encuestas nacionales de salud". Proyecto 86490-CONACyT.
- Galván-Ramírez ML, Covarrubias X, Rodríguez R, Troyo R, Alfaro N, Correa D. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in blood donors of Jalisco, México. *Transfusion.* 2005;45:281-2.
- Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, *et al.* Neonatal screening pilot study of *Toxoplasma gondii* congenital infection in México. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:142-4.
- Figueroa-Castillo JA, Duarte-Rosas V, Juárez-Acevedo M, Luna-Pastén H, Correa D. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from México. *J Parasitol.* 2006;92:394-5.
- García-Márquez LJ, Gutiérrez-Díaz MA, Correa D, Luna-Pastén H, Palma JM. Prevalence of *Toxoplasma gondii* specific antibodies and the relation to risk factors in cats of Colima, México. *J Parasitol.* 2007;93:1527-8.
- Caballero-Ortega H, Quiroz-Romero H, Olazarán-Jenkins S, Correa D. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. *Parasitology.* 2008;135:897-902.
- Caballero-Ortega H, Palma JM, García-Márquez LJ, Gildo-Cárdenas A, Correa D. Frequency and risk factors for toxoplasmosis in ovines of various regions of the State of Colima, México. *Parasitology.* 2008;135:1385-9.
- Besn e-Mérida A, Figueroa-Castillo JA, Martínez-Maya JJ, Luna-Pastén H, Calder n-Segura E, Correa D. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in domestic cats from Mexico City. *Vet Parasitol.* 2008;157:310-3.
- Dubey JP, Morales ES, Lehmanm T. Isolation and genotyping of 185 *Toxoplasma gondii* from free-ranging chickens from México. *J Parasitol.* 2004;90:411-3.
- Dubey JP, Velmurugan GV, Alvarado-Esquivel C, Alvarado-Esquivel D, Rodríguez-Pena S, Martínez-García S, *et al.* Isolation of *Toxoplasma gondii* from animals in Durango Mexico. *J Parasitol.* 2009;95:319-22.
- Cedillo-Peláez C, Rico-Torres CP, Salas-Garrido CG, Correa D. Acute toxoplasmosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in Mexico. *Vet Parasitol.* 2011, en prensa.
- Alvarado-Esquivel C, Rajenderan C, Ferreira L, Kwok O, Choudhary S, Alvarado-Esquivel D, *et al.* Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in wild birds in Durango, Mexico. *J Parasitol.* 2011, en prensa.

