

Caracterización molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* de triatominos recolectados en los municipios del Estado de Hidalgo, México

Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* isolates from the triatominos collected in the municipalities of the State of Hidalgo, Mexico

Víctor H. Pérez España¹, Claudia L. Morales Evangelista², Juan Carlos Vázquez Chagoyán³, Benjamín Valladares Carranza³, Teresa Romero Cortés¹, Jaime A. Cuervo Parra¹, Irma Martínez Hernández⁴, Julio C. Noguez García⁴ y José E. Aparicio Burgos¹

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*; PCR; *Triatoma*; enfermedad de Chagas; parásito
Keywords: *Trypanosoma cruzi*; PCR; *Triatoma*; Chagas disease; parasite

Recepción: 20-11-2018 / Aceptación: 21-01-2019

Resumen

Introducción: *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), está clasificado en seis linajes mediante marcadores moleculares de tipificación, que son fácilmente amplificados por técnicas de biología molecular. El objetivo del trabajo fue identificar y ubicar geográficamente a los aislados de *T. cruzi* que infectan naturalmente a los triatominos de los municipios del Estado de Hidalgo a través de la técnica de PCR, que amplifica fragmentos de la región intergénica del gen mini-exón.

Método: Se recolectaron 170 muestras de insectos hematófagos en 14 municipios del Estado de Hidalgo, México. El diagnóstico de laboratorio en las muestras de heces y de tejido digestivo de los triatominos, se realizó de manera convencional por microscopía óptica y por la técnica de PCR para determinar la presencia o ausencia de *T. cruzi* y para la identificación del linaje correspondiente del parásito.

Resultados: Se identificaron tres taxones de triatominos: *Triatoma dimidiata* (87/170), *Triatoma mexicana* (14/170) y *Triatoma gerstaeckeri* (7/170). En el 36.47% (62/170) de los especímenes colectados la especie no pudo ser identificada y se clasificaron únicamente como *Triatoma* spp. Se determinó la presencia del parásito en el 1.76% de los vectores analizados por el método parasitoscópico y en el 11.17% por el método de biología molecular. El total de los parásitos analizados corresponde al biotipo TcI de *T. cruzi*. En el ecotopo peridoméstico, se encontró la mayor abundancia de triatominos (80.58%) y el mayor porcentaje (10.58%) de infección por *T. cruzi*.

¹ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Escuela Superior de Apan. E-mail: joshekawa@hotmail.com

² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

³ Universidad Autónoma del Estado de México, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal

⁴ Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Hidalgo, Área de Entomología

Conclusiones: El vector más importante encontrado en la región en estudio fue *Triatoma dimidiata* seguido de *T. mexicana* y *T. gerstaeckeri* y el biotipo con el que están mayormente infectados es el TcI. Los triatomíneos encontrados se distribuían principalmente en hábitats peridomésticos en los municipios estudiados. Los resultados indican la existencia de riesgo de infección para los habitantes de esas regiones endémicas del Estado de Hidalgo, México.

Abstract

Introduction: *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), has been classified into six lineages using molecular typing markers, which are easily amplified by the polymerase chain reaction (PCR) technique. The objective of this work was to identify and geographically locate the isolates of *T. cruzi* that circulate naturally in triatomines of the municipalities of the State of Hidalgo, Mexico, through the amplification from the conserved region of the mini-exon gene by end point PCR.

Method: 170 specimens of hematophagous insects from 14 municipalities from the state of Hidalgo, Mexico, were collected. Optic microscopy and PCR from triatomine fecal and digestive tissue samples were used for laboratory diagnostic of *T. cruzi* infection and *T. cruzi* lineage classification.

Results: Three triatomines taxas were found: *Triatoma dimidiata* (87/170), *Triatoma mexicana* (14/170) y *Triatoma gerstaeckeri* (7/170). For 36.47% (62/170) of the collected specimens, species could not be determined and were classified as *T. spp.* *T. cruzi* infection was determined in 1.76% of the collected specimens through optic microscopy and in 11.18% through PCR. All the classified parasites correspond to the TcI biotype of *T. cruzi*. Most abundant populations of triatomines (80.58%), as well as, the highest percentage (10.58%) of *T. cruzi* infected insects, were found in the peridomestic ecotope.

Conclusion: The most important vector found in the región of study was *Triatoma dimidiata*, followed by *T. mexicana* and *T. gerstaeckeri* and the only *T. cruzi* biotype found to be infecting triatomines was TcI. The vectors were mainly distributed in the peridomiciliary habitats of the studied municipalities. Results indicate a *T. cruzi* represents a risk of infection for the inhabitants of the studied regions of the state of Hidalgo, Mexico.

Introducción

El protozoo llamado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es el agente etiológico que causa la enfermedad de Chagas. Esta enfermedad, es una de las causas más comunes de muerte relacionadas con insuficiencia cardiaca congestiva entre los adultos jóvenes en áreas endémicas de México, Sudamérica y Centroamérica (Cura and Viña, 2010). Actualmente la enfermedad de Chagas es considerada como una enfermedad infecciosa emergente de transmisión congénita, por transfusión sanguínea y/o por trasplante de órganos en los Estados Unidos y en países de Europa que reciben migrantes de países donde la enfermedad es endémica (Bern and Montgomery, 2009). La infección es transmitida de forma natural por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, vectores que se distribuye fundamentalmente en áreas endémicas rurales de América, dónde las malas condiciones socio-sanitarias favorecen su presencia (Hotez *et al.*, 2014).

T. cruzi se caracteriza por mostrar una estructura poblacional clonal y a menudo multiclonal, es decir, que su población está compuesta por varias subpoblaciones de parásitos (Tibayrenc *et al.*, 2018). Esta diversidad genética le confiere diferencias genotípicas y fenotípicas a cada una de las cepas del protozoario. Es posible que los humanos y otros hospederos, así como los triatomíneos se infecten con dos o más clones genéticamente diferentes (Andrade *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2000). El comportamiento biológico de cada cepa puede estar relacionada con su estructura genética (Brenière *et al.*, 2012). Esto puede tener influencia en las manifestaciones clínico-patológicas de la enfermedad, en el ciclo de transmisión y en la resistencia o sensibilidad a fármacos (Mejía-Jaramillo *et al.*, 2012). Las variedades de *T. cruzi* estudiadas han sido clasificadas en seis linajes (TcI a TcVI) (Zingales *et al.*, 2012). En pacientes chagásicos humanos, las variedades TcI, TcIV y TcV han sido asociadas a padecimientos cardiomiopáticos, mientras que los linajes TcII, TcV y TcVI a problemas digestivos (Zingales *et al.*, 2018). En este contexto, resalta el TcI como el linaje más abundante en el continente Americano, el cual puede estar asociado con los ciclos silvestres y domésticos de la enfermedad (Zingales *et al.*, 2018). Por otro lado, estudios contemporáneos que analizaron la resistencia o sensibilidad de diferentes cepas de *T. cruzi* a los fármacos más comunes, sugieren que una proporción importante de los parásitos de los diferentes linajes de *T. cruzi* presentan cierta resistencia a los fármacos comúnmente empleados para tratar la infección (Mendonça *et al.*, 2018). Sin embargo, en aislados de *T. cruzi* de la región norte de Sudamérica, se han observado ciertas diferencias en la resistencia a los fármacos. Por ejemplo, se ha reportado que los parásitos del linaje TcI presentan

resistencia al benznidazol más frecuentemente que los parásitos pertenecientes al biotipo II (Toledo *et al.*, 2004). Los demás linajes (III, IV, V y VI) han sido poco estudiados, pero en ensayos *in vitro* ya se ha observado que algunas cepas correspondientes a los linajes III, V y VI presentan cierta resistencia a dicho fármaco (Hamuy *et al.*, 2013). La resistencia a fármacos asociada a los diferentes linajes del parásito representa un problema clínico para el tratamiento efectivo de la enfermedad en humanos y es por eso importante determinar que linajes de *T. cruzi* circulan en cada región geográfica. En México, se ha reportado la presencia de los seis linajes de *T. cruzi* distribuidos de manera heterogénea en el país (revisado por López-Vivas *et al.*, 2018). Sin embargo, en estos estudios pueden considerarse sólo como la fase inicial de la epidemiología molecular del parásito en México, y por eso se requiere seguir realizando más estudios que complementen el conocimiento de la situación que el país guarda en relación al los biotipos de parásito existentes. En el estado de Hidalgo, México, que es una región endémica del parásito, no se han hecho estudios moleculares para determinar los linajes de los parásitos. Por tal motivo resulta pertinente conocer la base genética de los aislados de *T. cruzi* que habitan en el estado. El objetivo fue determinar la diversidad genética del *T. cruzi* que infecta a los triatomíneos recolectados en las regiones endémicas del Estado de Hidalgo, a través de la amplificación por PCR- punto final del fragmento de la secuencia de la región intergénica del gen mini exón de *T. cruzi*, el cual es considerado un marcador molecular de tipificación.

Método

Área de estudio

Los insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae fueron recolectados en 82 casas ubicadas en 14 municipios del Estado de Hidalgo (Atlapexco, Chapulhuacán, Huautla, Huejutla, Metztlán, Orizatlán, Pacula, Pisaflores, San Agustín Metzquitlán, Tecozautla, Tenango, Tianguistengo, Xochiatipan y Zimapan). Se recolectaron 170 triatomíneos durante los meses de abril a septiembre de 2016, la metodología de búsqueda de triatomíneos fue realizada de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector (NOM-032-SSA2-2002). Los insectos fueron recolectados por el personal de las brigadas antipalúdicas de las jurisdicciones sanitarias del Estado de Hidalgo, en un ejercicio de tres visitas por casa.

Identificación morfológica de los triatomos y examinación microscópica

Los triatomos se clasificaron por fechas y por localidades y se examinaron a través de microscopio estereoscópico. La identificación taxonómica de los triatomos se efectuó de acuerdo a las claves morfológicas de Lent and Wygodzinsky (1979). Se realizó el diagnóstico convencional (por la técnica de microscopía óptica), para determinar la presencia o ausencia de *T. cruzi* en los insectos. Por medio de la presión abdominal del triatomo se tomaron muestras de heces, se colocaron en un portaobjetos y se diluyeron con 50µl de solución PBS, pH 7.0, y se observaron a 40x a través del microscopio óptico (Souza, 2009).

Extracción del ADN

Para determinar la presencia o ausencia de *T. cruzi* en los triatomos colectados, además del diagnóstico microscópico, se realizó diagnóstico molecular por PCR. El ADN genómico del parásito se buscó en las heces de los triatomos. En triatomos vivos el ADN se extrajo de las heces y orina y en triatomos de los que no se podían extraer heces por alguna razón o porque estuvieran muertas, el ADN se obtuvo de los intestinos de cada insecto (la mezcla obtenida corresponde a 25 mg tejido, heces y orina). El ADN fue extraído y purificado utilizando el kit “Wizard® SV Genomic DNA Purification System” (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se confirmó la integridad del ADN de las muestras a través de la electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% y teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg / ml) (Sambrook and Russell, 2001).

Detección de *T. cruzi* en triatomos mediante PCR múltiple

Para la identificación y genotipificación de *T. cruzi* en los triatomos se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR-mul) para la amplificación de los fragmentos del gen mini-exón de *T. cruzi* del parásito con los iniciadores descritos por Souto *et al.* (1996), que discrimina al grupo TcI de los grupos TcII-TcVI. Esta discriminación se da por el tamaño de banda amplificado: 350 pb para TcI y 300 pb para todos los demás linajes. Se usaron los siguientes oligonucleótidos: TcI (hacia adelante) 5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3' (amplifica fragmentos de 350 pb); TcII-TcVI (hacia adelante) 5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3' (amplifica fragmentos de 300 pb) y TcI-TcVI (inverso) 5'-CCCCCTCCCAGGCCACACTG-3'. El volumen final para la reacción fue de 25 µl por tubo.

Se agregó 12.55 µl de H₂O, buffer polimerasa 5µl, MgCl₂ 2µl, 1µl de dNTPs, 10 picomoles de cada primer, 0.25 de Taq polimerasa (GoTaq Flexi DNA Polymerase, Promega) y 45 ng de AND purificado. Las condiciones para la reacción fueron las siguientes: desnaturalización de 95 °C por 1 minuto, 30 ciclos con etapas de desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, alineación a 61.6 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C por 30 segundos; por último se realizó una extensión final a 72 °C durante 6 minutos. Los productos finales de la PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % preparado con una solución amortiguadora de Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM (TAE 1×). Se utilizó como amortiguador de corrida la misma solución mezclada con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml para lograr la visualización de las bandas de ADN se utilizó el transiluminador de luz UV. Las fotos se obtuvieron con una cámara Canon power shot 5 MG pixeles.

Análisis estadístico

Los resultados del porcentaje de las frecuencias obtenidas por cada método se compararon mediante la prueba de Chi cuadrada (χ^2) con un nivel de significancia del 5%. El análisis estadístico fue realizado con el programa GraphPad Prism (GraPhPad Software Inc., USA).

Cuadro 1. Frecuencia de infección con *T. cruzi* e identificación entomológica de los triatomos capturados en los 14 municipios del Estado de Hidalgo

Municipio	Número de localidades	Triatomos positivos a <i>T. cruzi</i>		Biotipo	Ciclo Transmisión		Especies de triatomos recolectadas
		Microscopia óptica	PCR-mul		Intra domicilio	Peri domicilio	
Atlapexco (Casas=10)	8	0 (0%)	3(1.76%)	TcI	0	33	<i>T. dimidiata</i> 14 (8.24%) y <i>T.spp.</i> 9 (11.18%)
Chapulhuacán (Casas=9)	2	1 (0.59%)	1 (0.59%)	TcI	2	12	<i>T. dimidiata</i> 1 (0.59%), <i>T. spp.</i> 9 (5.29%) y <i>T. gerstaeckeri</i> 4 (2.35%)
Huautla (Casas=5)	3	0 (0%)	1 (0.59%)	TcI	0	16	<i>T. dimidiata</i> 13 (7.65%) y <i>T. spp.</i> 3 (1.76%)
Huejutla (Casas=10)	10	0 (0%)	3 (1.76%)	TcI	3	11	<i>T. dimidiata</i> 13 (7.65%) y <i>T. spp.</i> 1 (0.59%)
Metztitlán (Casas=5)	3	1 (0.59%)	1 (0.59%)	TcI	0	5	<i>T. mexicana</i> 5 (2.94%)
Orizatlán (casa=1)	1	0 (0%)	1 (0.59%)	TcI	0	1	<i>T. dimidiata</i> 1 (0.59%)
Pacula (Casas=1)	1	0 (0%)	0 (0%)	-	0	1	<i>T. spp.</i> 1 (0.59%)
Pisaflores (Casas=1)	1	0 (0%)	0 (0%)	-	0	1	<i>T. gerstaeckeri</i> 1 (0.59%)
San Agustín Metzquititlán (Casas=1)	1	0 (0%)	1 (0.59%)	TcI	0	1	<i>T. mexicana</i> 1 (0.59%)
Tecozautla (Casas=2)	2	0 (0%)	1 (0.59%)	TcI	0	2	<i>T. mexicana</i> 2 (1.18%)
Tenango (Casas=1)	1	0 (0%)	0 (0%)	-	0	1	<i>T. gerstaeckeri</i> 1 (0.59%)
Tianguistengo (Casas=13)	3	0 (0%)	0 (0%)	-	14	5	<i>T. dimidiata</i> 14 (8.24%), <i>T. spp.</i> 4 (2.35%) y <i>T. gerstaeckeri</i> 1 (0.59%)
Xochiatipan (Casas=18)	4	0 (0%)	6 (3.53%)	TcI	14	41	<i>T. dimidiata</i> 31 (18.24%) y <i>T. spp.</i> 24 (14.12%)
Zimapán (Casas=5)	3	1 (0.59%)	1 (0.59%)	TcI	0	7	<i>T. mexicana</i> 6 (3.53%) y <i>T. spp.</i> 1 (0.59%)
Porcentajes	43	1.76%	11.17% (<i>p</i> = 0.0004)	TcI	19.41%	80.58%	<i>T. dimidiata</i> = 51.17% <i>T. mexicana</i> = 8.23% <i>T. gerstaeckeri</i> = 4.11% <i>T. spp.</i> = 36.47%

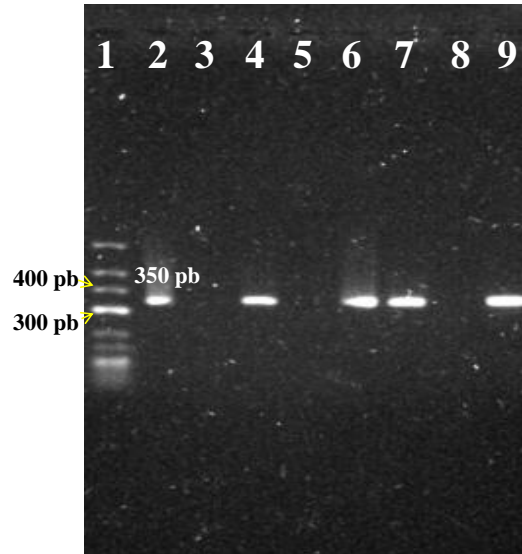


Figura 1. Amplificación de los fragmentos específicos del gen mini-exón (PCR-mul) con iniciadores reportados por Souto *et al.* 1996. En la figura la línea 1 corresponde al: MPM (Low DNA Mass ladder, Invitrogen™); línea 2: Control positivo *T. cruzi* Sylvio X10/4 (TcI); línea 3: Control negativo (H₂O); líneas 4 a la 9, corresponde a las muestras 1 – 6

Resultados y Discusión

El cuadro 1 resume la información acerca de los sitios de búsqueda, las especies de insectos encontradas, las frecuencias de triatomíneos infectados con *T. cruzi* y el linaje de *T. cruzi* encontrado en su caso. La búsqueda de triatomíneos se realizó en un total de 82 casas distribuidas en 14 municipios del Estado de Hidalgo. Se recolectaron 170 ejemplares y se identificaron tres especies: La principal especie de insectos identificada fue *T. dimidiata* (87/170; 51.17%), seguida por *T. mexicana* (14/170; 8.23%) y finalmente *T. gerstaeckeri* (7/170; 4.11%). A un porcentaje importante de triatomíneos encontrados no se les pudo asignar una clasificación ni de especie, ni de sexo, dado que el método morfológico no es muy confiable para hacer estas clasificaciones en los estados ninfales. De ahí que se clasificaran como *T. spp.* al 36.47% (62/170) de los triatomíneos encontrados. Pero de acuerdo a las proporciones de adultos encontradas podría asumirse que las ninfas también en su mayoría deberían ser *T. dimidiata*. Pero para no dejar este tipo de información sin definir, en futuros estudios sería interesante considerar hacer la determinación molecular de la especie de las ninfas recolectadas. El 80.58% (137/170) de los triatomíneos recolectados fueron encontrados en el peridomicilio, en tanto que el restante 19.41%

(33/170) de los insectos se recolectó del interior de los domicilios. De los ejemplares recolectados el 37.05% (63/170) fueron hembras adultas, 26.47% (45/170) machos adultos, y el resto eran ninfas no sexadas; 5.29% (9/170) del segundo estadio; 5.88% (10/170) del tercer estadio; 3.52% (6/170) del cuarto estadio y el 21.76% (37/170) del quinto estadio. Los ciclos de transmisión de *T. cruzi* se han clasificado en intradomiciliados (el de mayor riesgo para la salud pública), peridomiciliados y silvestres, principalmente de acuerdo al nicho ecológico que prefieren las distintas especies de triatomíneos (Salazar *et al.*, 2010). Los hallazgos en el presente estudio concuerdan con lo reportado en otros autores (Salazar *et al.*, 2010), en relación a que *T. dimidiata* se distribuye en el intradomicilio y el peridomicilio, en tanto que *T. mexicana* lo hace en el peridomicilio. *T. gerstaeckeri*, una especie que normalmente ha sido reportada en los tres ciclos de transmisión de *T. cruzi* (Martínez –Tovar *et al.*, 2013), se encontró tanto en el peridomicilio como en el intradomicilio, en los municipios de Capulhuacán y Tianguistengo, lo que puede indicar que esta especie se está adaptando al nicho ecológico doméstico en las zonas mencionadas, lo cual podría representar un mayor riesgo de salud para la población humana. También es interesante señalar que en estas dos localidades (Capulhuacán y Tianguistengo), *T. gerstaeckeri* y *T. dimidiata*, parecen comportarse como especies simpátricas. La existencia de especies de triatomíneos simpátricas no es una novedad, ya que otros autores han reportado una asociación simpátrica de hasta tres especies diferentes en México (Rodríguez *et al.*, 2011), pero hasta dónde sabemos, este es el primer reporte de la asociación simpátrica de *T. gerstaeckeri* y *T. dimidiata*.

En este estudio observamos que el PCR tiene mayor sensibilidad que la microscopía óptica en la detección de parásitos en heces de los triatomíneos ($p = 0.0004$) (Cuadro 1). La frecuencia de infección por *T. cruzi* encontrada entre las muestras de triatomíneos analizadas fue de 1.76% (3/170) por la técnica de microscopía óptica y el 11.17% (19/170) por PCR. Se observa una diferencia de la sensibilidad entre las dos técnicas de diagnóstico utilizadas era de esperarse, ya que previamente ha sido demostrado que la técnica de PCR es más sensible que la microscópica para la detección de *T. cruzi* a partir de sangre (Kirchhoff *et al.*, 1996) y de heces de chinches (Almeida *et al.*, 2008; Lardeux *et al.*, 2016).

Aunque el diagnóstico por PCR es más sensible que el microscópico, es posible que aún por PCR la prevalencia de infección por *T. cruzi* en triatomíneos encontrada en el presente trabajo esté siendo subestimada, ya que ha sido reportado que dependiendo del tipo de marcador

molecular utilizado en la prueba de PCR, la capacidad de detección puede cambiar (Lardeux *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2008). De ahí que futuros estudios deberían determinar que marcadores son los más adecuados para hacer más sensible y confiable la técnica de PCR para la detección de infecciones por *T. cruzi* en insectos vectores. El promedio de chinches infectadas encontrado por el método microscópico en este estudio en el municipio de Metztitlán (20%) es aparentemente mucho mayor que lo reportado en un estudio previo para el mismo municipio (7.7%) (Becerril *et al.*, 2010; Castro-Tenorio *et al.*, 2017). Sin embargo, en el presente reporte sólo se analizaron 5 chinches en Metztitlán, y la diferencia en la prevalencia de infección por *T. cruzi* en las chinches estudiadas en ese municipio, podría tener más que ver con un problema del tamaño de muestra que con una diferencia real en prevalencia. La prevalencia general de triatominos infectados encontrada en el presente estudio, aunque no es alta en comparación con otras regiones de México, como la que se ha reportado en la región sur del Estado de México (aproximadamente 30%; Estrada-Franco *et al.*, 2006, Medina-Torres *et al.*, 2016, López Vivas *et al.*, 2108), debe ser tomada en cuenta por las autoridades sanitarias del estado de Hidalgo en su esfuerzo por prevenir y controlar el riesgo de infecciones por *T. cruzi* en humanos.

En cuanto a la genotipificación de *T. cruzi* por la amplificación de la región intergénica del gen mini exón, se encontró únicamente el biotipo TcI en las tres especies de triatominos colectados (Figura 1). Hasta donde sabemos, éste es el primer reporte de tipificación molecular de *T. cruzi* en el Estado de Hidalgo. Estudios previos en esta área geográfica, sólo se han reportado los porcentajes de prevalencia que varían de entre 1.5% al 8.21% en humanos seropositivos a *T. cruzi* y la prevalencia de infección en cuatro especies de triatominos endémicos de la región: *T. barberi* (Usinger), *T. dimidiata* (Latreille), *T. mexicana* (Herrich-Schaeffer) y *T. gerstaeckeri* (Stål) (Velasco *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 2006). En estudios previos se ha reportado la presencia de los seis linajes (TcI-TcVI) en México, mediante el análisis de la secuencia del gen mini-exón del *T. cruzi*. Pero los estudios de epidemiología molecular de *T. cruzi* son incipientes en nuestro país. El linaje más reportado y por lo tanto mejor conocido es el TcI, que se ha encontrado en humanos, en diversos mamíferos y en varias especies de triatominos infectados. En el caso de los linajes TcII-TcVI existen pocos estudios en México, y en estos se ha reportado la presencia de los diferentes linajes de *T. cruzi* en heces de varias especies vectoras (*Triatoma dimidiata*, *Triatoma longipennis* y *Meccus pallidipennis*) distribuidas en varias áreas geográficas de la República Mexicana (Ramos-Ligonio *et al.*, 2012; Ibáñez-Cervantes *et al.*, 2013; López-

Vivas *et al.*, 2018). Sin embargo, hace falta hacer estudios más minuciosos acerca de la epidemiología molecular de *T. cruzi* en humanos ya que estos linajes no se han reportado en pacientes chagásicos en México (Salazar-Schettino *et al.*, 2016). Por lo que queda como una asignatura pendiente, el determinar la frecuencia con la que los diferentes linajes de *T. cruzi* encontrados en México están produciendo infecciones en humanos. Los datos del presente reporte sugieren que las infecciones por *T. cruzi* en humanos en el estado de Hidalgo, deben estar siendo causadas principalmente por parásitos del linaje TcI. Esto es relevante dada la resistencia que ha sido encontrada en parásitos de este biotipo a los fármacos utilizados terapéuticamente para combatir la infección. De ahí que se recomienda seguir buscando alternativas terapéuticas y métodos de prevención y control de la enfermedad más efectivos, si se pretenden reducir los riesgos a la salud pública ocasionados por *T. cruzi* tanto a nivel regional como global.

Conclusiones

Existe una frecuencia del 11.17 % (19/ 170 muestras) de triatomíneos infectados por *T. cruzi* a través de la técnica molecular de PCR multiplex que amplifica al gene mini-exón. Se encontró el biotipo TcI de *T. cruzi* en tres especies de insectos hematófagos; *T. dimidiata*, *T. mexicana* y *T. gerstaeckeri*. Los datos sugieren que existe una circulación activa del linaje TcI en el ecotopo peridoméstico en 10 municipios del Estado de Hidalgo y abre un riesgo importante de infección en humanos, que habitan en estas zonas endémicas.

Agradecimientos

Se agradece al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP-SEP) con clave: UAEH-PTC-673, DSA/103.5/15/7001.

Referencias

Almeida P. S., Ceretti Júnior W., Obara M., T., Santos H. R., y Barata J., M. (2008). Survey of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae) fauna in domestic environments and natural infection by Trypanosomatidae in the State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, 41:374-380.

- Andrade L. O., Machado C. R. S., Chiari E., Pena S. D. J., y Macedo A. M. (1999). Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*, 100:163-72.
- Bern C., y Montgomery S. P. (2009). An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis*, 49(5), e52-e54.
- Brenière, S. F., Waleckx, E., Magallón-Gastélum, E., Bosseno, M. F., Hardy, X., Ndo, C., y Kengne, P. (2012). Population genetic structure of *Meccus longipennis* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), vector of Chagas disease in West Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 254-262.
- Castro-Tenorio, O., González-Trejo, M., Molina-Trinidad, E. M., Imbert-Palafox J. P., del Rosario-Tovar Ma. y Becerril-Flores, M. A. (2017). La entomofagia en el estado de Hidalgo como un mecanismo para la adquisición de la enfermedad de Chagas, *Entomología mexicana*, 4: 566-572.
- Coura, J. R., y Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, 465, (n7301_supp) S6-S7.
- Becerril, M. A., Ángeles-Pérez, V., Noguez-García, J. C., y Imbert-Palafox, J. L. (2010). Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Metztitlán, estado de Hidalgo, México, mediante la caracterización de unidades domiciliarias y sus índices entomológicos. *Neotropical Entomology*, 39(5), 810-817.
- Estrada-Franco, J. G., Bhatia, V., Díaz-Albiter, H., Ochoa-García, L., Barbabosa, A., Vázquez-Chagoyan, J. C. y Garg, N. (2006). Human *Trypanosoma cruzi* infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 12(4), 624.
- Gómez, J. V. G., Juárez, S. M., y Espinosa, R. M. O. (2006). Prevalencia de seropositividad a *T. cruzi* en Hidalgo: algunas características de las viviendas y la convivencia con animales domésticos. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 49(5): 190-193.
- Hamuy, R., Acosta, N., López, E., Ferreira, M. E., y de Bilbao, N. V. (2013). Determinación de la sensibilidad *in vitro* de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* al benznidazol y al extracto de hoja de la planta *Zanthoxylum chiloperone*. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 11(2).

- Hotez, P. J., Alvarado, M., Basáñez, M. G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M. y Carabin, H. (2014). The global burden of disease study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2865.
- Ibáñez-Cervantes, G., Martínez-Ibarra, A., Noguera-Torres, B., López-Orduña, E., Alonso, A. L., Perea, C. & León-Ávila, G. (2013). Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. *Parasitology International*, 62(1), 36-43.
- Kirchhoff, L. V., Votava, J. R., Ochs, D. E. y Moser, D. R. (1996). Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), 1171-1175.
- Lardeux, F., Aliaga, C., y Depickère, S. (2016). Bias due to methods of parasite detection when estimating prevalence of infection of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Vector Ecology*, 41(2), 285-291.
- Lent, H., y Wygodzinsky, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American museum of Natural History*, 163(3), 123-520.
- López-Vivas, F. I., Vázquez-Chagoyán, J. C., Acosta-Dibarrat, J. P., Medina-Torres, I., Díaz-Albiter, H. M., Fernández-Rosas, P., y de Oca-Jiménez, R. M. (2018). Molecular Characterization of *Trypanosoma cruzi* in Infected *Meccus pallidipennis* in the Southern Region of the State of Mexico, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 18(12), 683-689.
- Martínez-Tovar, J. G., Rodríguez-Rojas, J. J., Arque-Chunga, W., Lozano-Rendón, J. A., Ibarra-Juárez, L. A., Dávila-Barboza, J. A. y Rebollar-Téllez, E. A. (2013). Nuevos registros geográficos y notas de infección de *Triatoma gerstaeckeri* (Stål) y *Triatoma rubida* (Uhler) (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) en Nuevo León y Coahuila, México. *Acta Zoológica Mexicana*, 29(1), 227-233.
- Medina-Torres Imelda, Montes-de-Oca-Jiménez Roberto, Vázquez-Chagoyán Juan C, Rodríguez-Vivas Roger I., López Vivas Fátima I., Zaldívar Gómez Alejandro y Reyes-Rodríguez Nydia E. (2016). Determination of entomological indicators of triatomines associated with human housing in the State of Mexico. *Indian Journal of Veterinary Research*, 25: (2).

- Mendonça, A. A. S., Coelho, C. M., Veloso, M. P., Caldas, I. S., Gonçalves, R. V., Teixeira, A. L. y Novaes, R. D. (2018). Relevance of Trypanothione Reductase Inhibitors on *Trypanosoma cruzi* Infection: A Systematic Review, Meta-Analysis, and *In Silico* Integrated Approach. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 24.
- Mejía-Jaramillo, A. M., Fernández, G. J., Montilla, M., Nicholls, R. S., y Triana-Chávez, O. (2012). Sensibilidad al benzonidazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. *Biomédica*, 32(2), 196-205.
- Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html>
- Pinto A. S., Lana M., Britto C., Bastrenta B., y Tibayrenc M. (2000). Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Int J Parasitol*, 30, 843-8.
- Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., López-Monteón, A., y Dumonteil, E. (2012). Extensive diversity of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units circulating in *Triatoma dimidiata* from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (7), 1341-1343.
- Rodríguez-Bataz, E., Noguera-Torres, B., Rosario-Cruz, R., Martínez-Ibarra, J. A., y Rosas-Acevedo, J. L. (2011). Triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) vectores de *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, en el estado de Guerrero, México. *Revista Biomédica*, 22 (1), 31-40.
- Salazar-Schettino, P. M., Cabrera-Bravo, M., Vázquez-Antona, C., Zenteno, E., De Alba-Alvarado, M., Gutierrez, E. T. & Bucio-Torres, M. I. (2016). Chagas disease in Mexico: report of 14 cases of chagasic cardiomyopathy in children. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 240(3), 243-249
- Salazar-Schettino, P. M., Rojas Wastavino, G. E., Cabrera Bravo, M., Bucio Torres, M. I., Martínez Ibarra, J. A., Monroy Escobar, M. C., y Torres Gutiérrez, E. (2010). Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(1), 57-81.
- Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose gel electrophoresis. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 1, 3.
- Souza, W. D. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 89-100.

- Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A., y Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83(2), 141-152.
- Tibayrenc, M. y Ayala, F. J. (2018). A misleading description of the predominant clonal evolution model in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 187:13-14.
- Toledo, M. J. O., Bahia, M. T., Veloso, V.M., Carneiro, C. M., Machado-Coelho, G. L. L., Alves, C. F., y Lana, M. (2004). Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 1045-1053.
- Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J. L., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Guzmán-Bracho, C., Magos, C. y Sepúlveda, J. (1992). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública de México*, 34(2), 186-196.
- Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38-52.