



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología

**Validación de una prueba de PCR en tiempo real para  
el diagnóstico de la enfermedad de Chagas**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga

**AUTOR**

Fiorella Viviana CORONADO MARQUINA

**ASESOR**

Ruth GARCÍA DE LA GUARDA

Carlos PADILLA ROJAS

Lima, Perú

2016

## RESUMEN

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el causante de la enfermedad de Chagas, la cual afecta principalmente a la población de América Latina y es transmitido vectorialmente por insectos triatomíneos. El diagnóstico de la infección depende de la etapa en la que se encuentra la enfermedad: en la fase aguda se aplican los métodos parasitológicos y en la fase crónica son necesarios los métodos serológicos y moleculares. Sin embargo, las primeras manifestaciones clínicas suelen ser leves y dispersas siendo confundidas con infecciones comunes, provocando la progresión de la enfermedad. En Perú, las muestras son evaluadas por un método directo (microscopía) y por dos pruebas serológicas (ELISA e IFI) para confirmar el diagnóstico de la enfermedad.

En el presente trabajo se estandarizó una prueba de PCR en tiempo real (Q-PCR) para el diagnóstico de la enfermedad y evaluar las estimaciones de validación. La prueba está dirigida a la amplificación del ADN satelital del parásito *T. cruzi* y presenta un límite de detección de 0,005 equivalentes genómicos de parásito. El método fue evaluado con un panel de muestras de sangre de pacientes con diagnóstico serológico conocido (utilizado como *gold estándar*), pero de estadio clínico no determinado. El ensayo presentó una sensibilidad clínica de 83% y una especificidad de 100%, determinando una buena concordancia. Asimismo, la prueba fue capaz de detectar ADN de parásito en muestras de heces de triatomíneos.

La prueba demostró ser eficiente para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y podría ser aplicada en la fase aguda y crónica, incluso cuando el nivel de parasitemia en sangre es bajo. Además, cuando los métodos convencionales no son concluyentes, la prueba de Q-PCR permite una detección temprana y oportuna de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, estandarización, PCR en tiempo real, *Trypanosoma cruzi*, validación,

## ABSTRACT

Chagas disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, it affects mainly Latin America and is transmitted vectorially by triatomine insects. The diagnosis of Chagas disease depends on the stage of the disease: in the acute phase parasitological methods are applied and in the chronic phase serologic and molecular methods are used. However, early clinical manifestations are usually minor and disperse being confused with viral infections, causing disease progression. To confirm the diagnosis of Chagas disease, a direct method (microscopy) and two serological tests (ELISA and IFI) are performed as routine in Perú.

The aim of this project was to standardize a real-time PCR assay for diagnosis of the disease and to evaluate estimates validation. The target sequence was the satellite-DNA of *T. cruzi*, which showed a detection limit of 0.005 genome equivalents of parasite. The method was evaluated with a panel of blood samples from patients with serologic diagnosis known (used as gold standard), but undetermined clinical stage. The test has a clinical sensitivity of 83% and a specificity of 100%, determining a good agreement. In addition, the assay was able to detect the target sequence in triatomine fecal samples.

The test demonstrated to be efficient for the diagnosis of Chagas disease and it can be applied in both acute and chronic phase of the disease, even though parasitemia level is low. Furthermore, when conventional methods are inconclusive, the Q-PCR assay enables early and appropriate detection of infection by *Trypanosoma cruzi*.

Key words: Chagas disease, standardization, real time PCR, *Trypanosoma cruzi*, validation