

Evaluación de la PCR a tiempo real RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 para la detección cualitativa de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas

Maria Delmans Flores-Chavez^{1,2}, Leonie-Sophie Hecht³, Ismael Ibanez¹, Emilia García¹, Javier Nieto¹, Karin Rottengatter³

¹ Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España ² Fundación Mundo Sano-España, Madrid, España ³ Altona Diagnostics GmbH, Hamburg, Alemania

INTRODUCCIÓN:

A pesar del debate actual sobre el papel de la PCR como herramienta de diagnóstico en la Enfermedad de Chagas, en España esta técnica es útil para detectar parásitos en circulación. En este sentido permite la confirmación de la infección congénita cuando existe una sospecha clínica, y en la fase crónica de la infección es la única herramienta que permite monitorizar la parasitemia en menor tiempo y de manera sencilla. Considerando estos antecedentes, el objetivo de este estudio fue validar la PCR a tiempo real RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 en comparación con el sistema de detección de ADN de *T. cruzi* in-house establecido en el Centro Nacional de Microbiología.

MATERIALES / MÉTODOS:

Muestras: Se incluyeron 96 muestras de sangre pre-procesadas con guanidina 6M EDTA 0,2M pH8, 68 muestras correspondían a pacientes con enfermedad de Chagas, y 28 a individuos no infectados por *T. cruzi*.

Extracción de ADN: El ADN fue obtenido utilizando el kit *High Pure Template* (Roche, Alemania), siguiendo el procedimiento validado en Ramírez et al. 2015. Para evaluar la eficiencia de la extracción se utilizó el control interno proporcionado en el kit de la PCR a tiempo real (Altona diagnostics, Alemania), según las indicaciones del prospecto.

Amplificación: Para comprobar la validez del nuevo extracto, se realizó la PCR convencional in-house siguiendo las condiciones establecidas en el CNM-ISCIII. La amplificación mediante la PCR a tiempo real *RealStar® Chagas PCR Kit 1.0* fue llevado a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante en el termociclador Rotor-Gene® (Qiagen, Alemania).

RESULTADOS:

El total de los casos tanto con reactivación aguda como infección congénita presentaron resultados positivos mediante la PCR a tiempo real RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

Las 28 muestras de individuos no infectados por *T. cruzi* presentaron resultados negativos.

De las 41 muestras de los individuos con infección crónica, 37 presentaron parasitemia detectable, de ellos 33 fueron positivos mediante RealStar® Chagas PCR Kit 1.0.

Tabla 2: Comparación cualitativa de los resultados de la PCR in house kDNA y la PCR a tiempo real RealStar® Chagas

	Definición de caso	N	kDNA-PCR		RealStar® Chagas PCR Kit 1.0	
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Enfermedad de Chagas	Infección congénita	14	14		14	
	Reactivación aguda en inmunosuprimidos	13	13		13	
	Infección crónica	41	37	4	33	8
Grupo control	Adultos no infectados	8		8		8
	Niños no infectados	10		10		10
	Individuos con Leishmaniasis	5		5		5
	Individuos con Malaria	5		5		5
	TOTAL	96	64	32	60	36

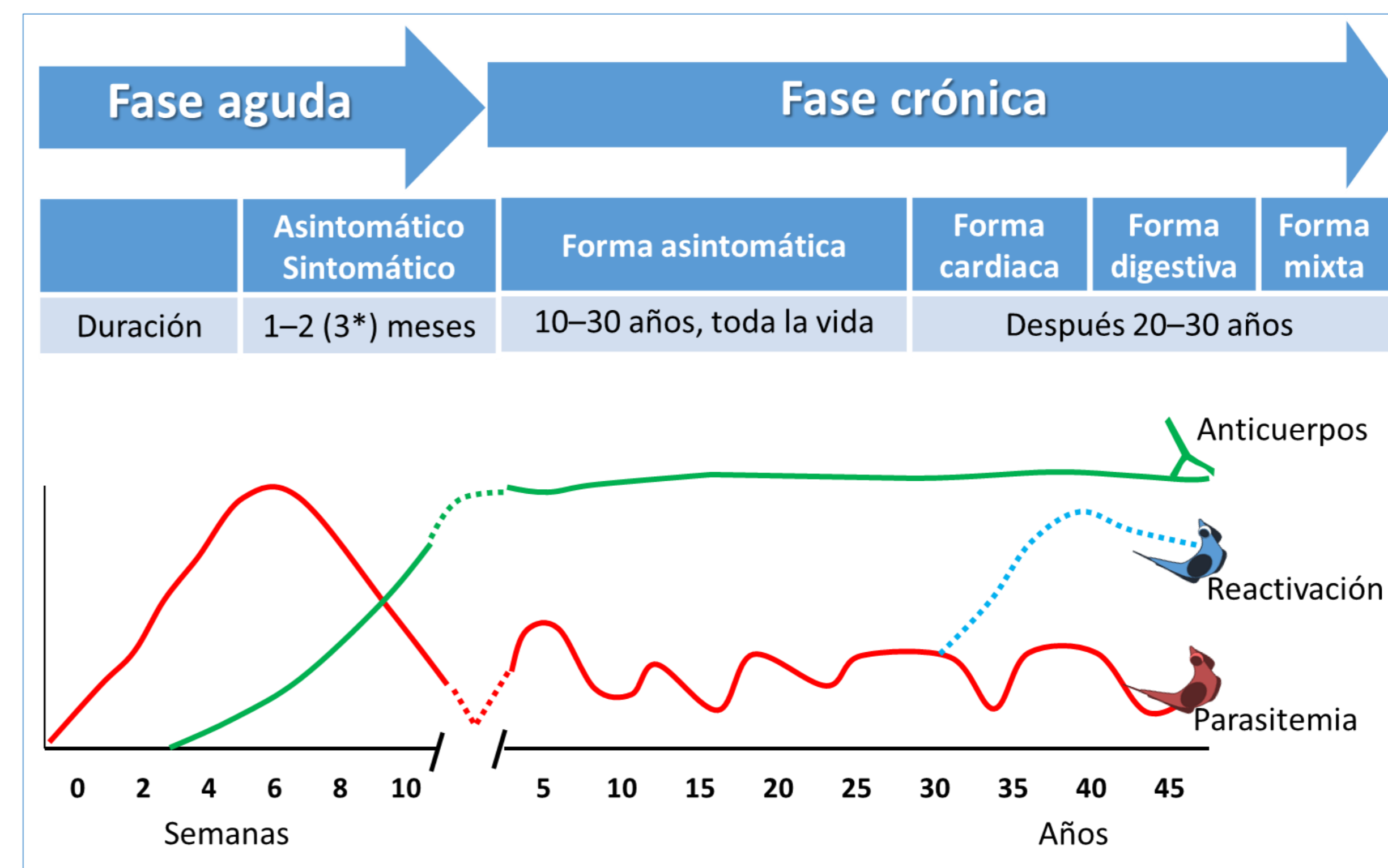


Figura 1: Características de la infección por *T. cruzi*

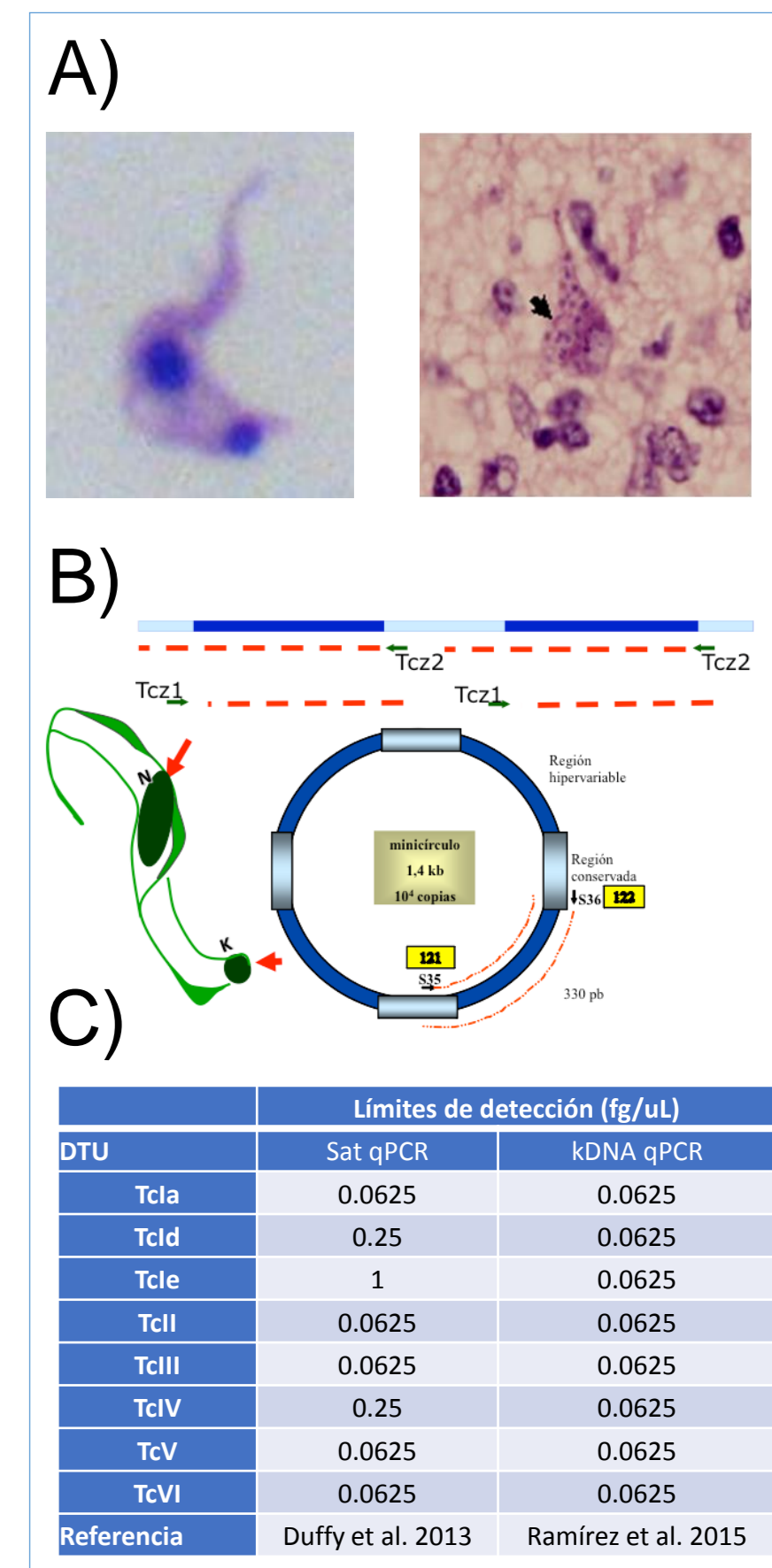


Figura 2: A) Tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*. B) Dianas para la PCR de *T. cruzi*. C) Límites de detección de las principales PCR de *T. cruzi*

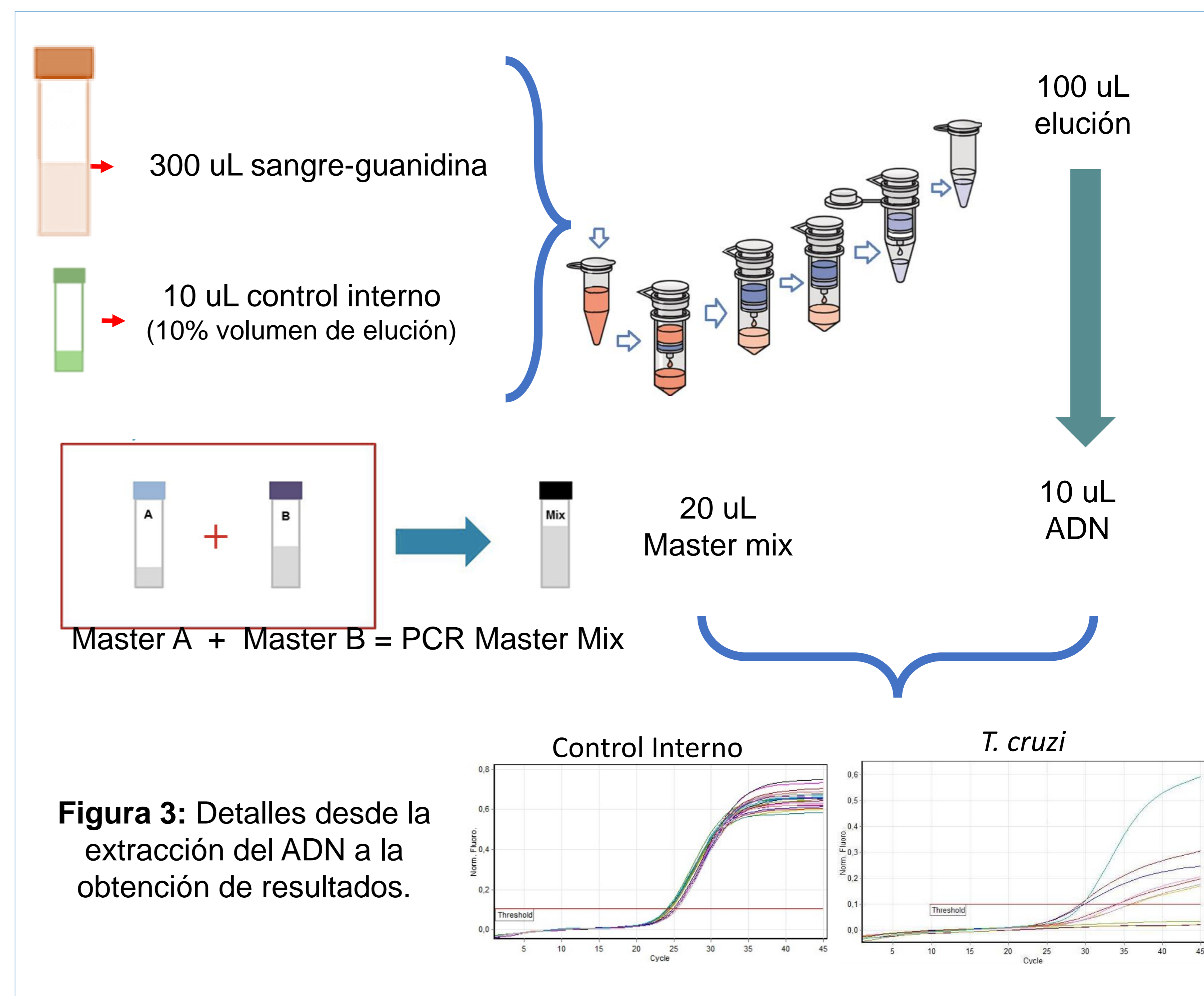


Figura 3: Detalles desde la extracción del ADN a la obtención de resultados.

La sensibilidad de la PCR RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 es elevada en la fase aguda (100%, IC 95%: 82,3 – 100%). Los resultados obtenidos con las muestras de individuos en fase crónica refleja la dificultad del diagnóstico molecular en esta fase. Su especificidad fue destacable (100%, IC 95%: 87,7 – 100%).

CONCLUSIONES:

- Los resultados muestran la idoneidad de la PCR RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 para la detección cualitativa del ADN de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre, en particular en casos de infección congénita y reactivación aguda.
- La infección crónica por *T. cruzi* continua siendo un reto para las herramientas moleculares.
- La detección de bajas cargas parasitarias requiere un análisis seriado de diferentes muestras de un mismo paciente.

REFERENCIAS

- Norman *et al.*; Ann Trop Med Parasitol 2011; 105: 425–30.
- Duffy *et al.*; PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(1):e2000.
- Ramírez JC, *et al.*; J Mol Diagn. 2015 Sep;17(5).

Personas de contacto:

María Flores: mflores@externos.isciii.es; maria.flores@mundosano.org
Karin Rottengatter: Karin.rotteingatter@altona-diagnostics.com; info@altona-diagnostics.com