

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
2. Cuerpo	4
2.1. Marco Teórico	4
2.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.1.2. Insecto vector: Triatomino	8
2.1.3. Genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
2.1.4. Enfermedad de Chagas	9
2.1.5. Diagnóstico de Enfermedad de Chagas	13
2.1.6. Técnica de Amplificación Isotérmica de ADN Mediada por Asa (LAMP)	14
2.1.7. Aplicaciones de la técnica	22
2.2. Materiales y Métodos	25
2.2.1. Selección de la secuencia blanco	25
2.2.2. Identificación de la secuencia consenso	25
2.2.3. Diseño de partidores LAMP	25
2.2.4. Extracción de material genético	26
2.2.4.1. Materiales	26
2.2.4.2. Metodología	27
2.2.5. Reacción de LAMP	27
2.2.5.1. Materiales	27
2.2.5.2. Metodología	28
2.2.6. Detección colorimétrica de amplificación por LAMP	29
2.2.6.1. Materiales	29
2.2.6.2. Metodología	29
2.2.7. Preparación de controles: positivo, negativo y de reactivos.	30
2.2.7.1. Materiales	30
2.2.7.2. Metodología	30
2.2.8. Electroforesis en gel de agarosa	31
2.2.8.1. Materiales	31
2.2.8.2. Metodología	31
2.2.9. Estandarización de la amplificación isotérmica mediada por asa, LAMP	31
2.2.9.1. Materiales	31
2.2.9.2. Metodología	32
2.2.10. Análisis de sensibilidad y especificidad analítica	32
2.2.11. Materiales	32
2.2.12. Metodología	33
2.2.13. Validación estadística	34

2.2.14. Comparación teórica y económica de la técnica de LAMP y la reacción de PCR convencional, en laboratorios de baja complejidad	36
2.3. Resultados	38
2.3.1. Elección del marcador y diseño de partidores	38
2.3.2. Pruebas iniciales con muestras control	39
2.3.3. Evaluación de la implementación de la técnica de LAMP	44
2.4. Discusión	45
3. Conclusiones	54
Bibliografía	56
Anexo A. Marco Teórico	62
A.1. Unidades Discretas de Tipificación	62
A.2. Algoritmo de detección de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> en el recién nacido, hijo de madre con enfermedad de Chagas.	64
Anexo B. Metodología	65
B.1. Cálculo para la preparación de solución madre de cada partidor	65
B.2. Cálculo para la preparación de la solución de trabajo y mezcla de partidores (Primer MIX)	66
B.3. Cálculo de molaridad de reactivos del tampón con colorímetro	68
Anexo C. Resultados	70
C.1. Gen representante de cada DTU	70
C.2. Secuencia de partidores diseñados	70
C.3. Análisis de partidores diseñados	72
C.3.1. Identificación secuencia a amplificar, alineamiento manual	72
C.3.2. Alineamiento de secuencias del gen rARN 18S, de diferente DTU y secuencia amplificada por cada grupo de partidores	74
C.3.3. Alineamiento partidor LB, Grupo 4	80
C.4. Estimación económica	81
Anexo D. Discusión	83
D.1. Cálculo total de muestras a analizar	83