

## COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE *Giardia* spp. MEDIDOS POR PCR CONVENCIONAL

Kathia Tarqui-Terrones<sup>1,2,a,b</sup>, Juana I. Silva-Molina<sup>1,2,a</sup>, María Beltrán-Fabián<sup>1,a</sup>, Silvia Zevallos-Vara<sup>3,a</sup>, Egma Mayta-Huatuco<sup>2,a,c</sup>

### RESUMEN

**Objetivos.** Comparar diferentes métodos de extracción de ADN a partir de quistes y trofozoítos de *Giardia* spp. mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional. **Materiales y métodos.** Se aislaron quistes de *Giardia* spp. a partir de 65 muestras coprológicas procedentes de hospitales de referencia nacional, obteniéndose una carga promedio de  $5 \times 10^4$  parásitos. Asimismo, se cultivaron trofozoítos de *Giardia intestinalis* (ATCC® 30957™) obteniéndose una carga parasitaria de  $5 \times 10^6$ . Se compararon once métodos de extracción para quistes y seis para trofozoítos. La concentración y pureza del ADN extraído se determinó por espectrofotometría y el rendimiento de la extracción se evaluó mediante la amplificación de los genes beta giardina (bg) y glutamato deshidrogenasa (gdh) por PCR semi-anidada. **Resultados.** Se observó que el método I mostró la mayor concentración de ADN a partir de quistes (12,24 ng/μL), pureza (1,4) y mejor rendimiento (100% amplificación bg, 60% gdh) en comparación con los otros métodos evaluados. En el caso de los trofozoítos el método que no tuvo pretratamientos presentó la mayor concentración de ADN, pureza y rendimiento (26,56 ng/μL; 1,85; 100% amplificación bg y gdh). **Conclusiones.** Los pretratamientos mecánicos, de choque térmico y enzimáticos son necesarios para la ruptura de la pared quística de *Giardia* spp., siendo el marcador molecular bg de mayor rendimiento para detección de ADN de quistes. Los trofozoítos no requieren pretratamientos para lograr resultados satisfactorios. Se cuenta con una metodología reproducible para la extracción de ADN de *Giardia* spp. a partir de cualquier estadio evolutivo.

**Palabras clave:** *Giardia*; ADN; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Trofozoítos (fuente: DeCS BIREME).

## COMPARISON OF METHODS OF DNA EXTRACTION FROM *Giardia* spp. MEASURED BY CONVENTIONAL PCR

### ABSTRACT

**Objectives.** To compare different methods of DNA extraction from cysts and trophozoites of *Giardia* spp. using the conventional polymerase chain reaction (PCR) technique. **Materials and Methods.** Cysts of *Giardia* spp. were isolated from 65 coprological samples from national reference hospitals, obtaining an average load of  $5 \times 10^4$  parasites. In addition, *Giardia intestinalis* trophozoites (ATCC® 30957™) were cultured obtaining a  $5 \times 10^6$  parasitic load. Eleven extraction methods for cysts and six for trophozoites were compared. The concentration and purity of the extracted DNA were determined by spectrophotometry and the extraction yield was assessed by amplification of the β-giardin (bg) and glutamate dehydrogenase (gdh) genes with a semi nested PCR assay. **Results.** It was observed that method 1 showed the highest concentration of DNA from cysts (12.24 ng/μL), purity (1.4) and best performance (bg: 100% amplification; gdh: 60% amplification) compared to the other methods evaluated. In the case of trophozoites, the method without pre treatment showed the highest level of DNA concentration, purity, and yield (26.56 ng/μL; 1.85; 100% amplification of bg and gdh, respectively). **Conclusions.** Mechanical, thermal shock, and enzymatic pre-treatments are necessary for the rupture of the cystic wall of *Giardia* spp. making it the highest-yielding bg molecular marker for detecting cyst DNA. Trophozoites do not require pre-treatment to achieve satisfactory results. A reproducible methodology for the extraction of DNA from *Giardia* spp. from any evolutionary stage is available.

**Keywords:** *Giardia*; DNA; Polymerase Chain Reactions; Trophozoites (source: MeSH NLM).

<sup>1</sup> Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

<sup>2</sup> Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>3</sup> Hospital Nacional Sergio E. Bernales. Lima, Perú.

<sup>a</sup> Bióloga; <sup>b</sup> magister en Epidemiología; <sup>c</sup> doctora en Ciencias.

Recibido: 31/12/2018 Aprobado: 17/07/2019 En línea: 26/08/2019

## INTRODUCCIÓN

*Giardia* spp. es uno de los principales parásitos que afecta al ser humano <sup>(1)</sup>. Millones de personas alrededor del mundo padecen de anemia y desnutrición crónica a causa de este protozooario entérico <sup>(2)</sup>, y en Perú se estima una prevalencia entre 15 y 18% <sup>(3)</sup>. Presenta dos estadios evolutivos claramente diferenciados que se adaptan a distintas condiciones ambientales; el trofozoíto, forma invasiva responsable de los síntomas de la enfermedad; y el quiste, forma de resistencia, responsable de la transmisión de huésped a huésped <sup>(4)</sup>.

El uso de técnicas moleculares en los estudios de parasitología como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muestran una elevada sensibilidad para la detección de casos con bajos niveles de infección y para discriminar entre variantes genéticas de los aislados; en el caso de la giardiasis se ha reportado una sensibilidad de 80% a 100% <sup>(5)</sup> y especificidad del 100% al ser comparado con ADN procedente de muestras humanas con otros parásitos como *Blastocystis hominis*, *Chilomastix mesnili*, y *Entamoeba coli* <sup>(4,6)</sup>.

Los métodos de extracción tradicionales *in house* utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas y lípidos del ADN a fin de aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede durar varias horas <sup>(7)</sup>. Los métodos comerciales son más rápidos <sup>(8)</sup>, están basados en membrana de sílica, facilitando con ello la adsorción de la molécula de ADN a la membrana cargada positivamente para lograr el aislamiento de ADN integro con calidad y cantidad adecuadas, libre de contaminantes e inhibidores <sup>(9)</sup>; garantizando el diagnóstico molecular, disminuyendo falsos negativos, y mejorando su sensibilidad.

En Perú, existe escasa información sobre métodos de extracción de ADN de parásitos como *Giardia* spp., lo que limita el conocimiento de la tipificación molecular de especies nativas circulantes, así como el estudio de la resistencia molecular frente a drogas. La selección del método de extracción es un paso fundamental en las técnicas moleculares y depende del organismo bajo estudio y del tipo de muestra; en el caso de *Giardia* spp. el quiste del parásito es el estadio más utilizado <sup>(4)</sup>. Cabe resaltar que, su pared quística es gruesa, está compuesta por proteínas e hidratos de carbono, lo que le confiere resistencia a la degradación química, siendo necesaria la aplicación de diferentes pretratamientos como choque térmico, degradación enzimática, efecto mecánico o la combinación de estos para lograr su ruptura o degradación <sup>(10,11)</sup>. Por lo tanto, es importante evaluar su utilidad e implicancia en la calidad de ADN y en el éxito de la amplificación por PCR.

Con el propósito de optimizar un método de extracción de ADN reproducible, óptimo y sencillo para la detección de *Giardia* spp. en cualquier estadio evolutivo se compararon diferentes métodos de extracción de ADN a partir de quistes

## MENSAJES CLAVE

**Motivación para realizar el estudio.** Se evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN a partir de quistes y trofozoítos de *Giardia* spp. ante la necesidad de implementar metodologías más sensibles para el diagnóstico y tipificación molecular de la giardiasis.

**Principales hallazgos.** Los resultados indican que para optimizar la extracción de ADN parasitario a partir de quistes es necesario realizar pretratamientos mecánicos, enzimáticos y de choque térmico, para aumentar la concentración de ADN y detección molecular del agente.

**Implicancias.** Este trabajo sirve de base para realizar estudios de caracterización y resistencia molecular de *Giardia* spp. en el país ya que es posible extraer ADN de la forma invasiva e infectante del parásito.

y trofozoítos del parásito mediante PCR semianidado usando dos marcadores moleculares, gen glutamato deshidrogenasa (gdh) y betagiardina (bg).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DISEÑO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de tipo descriptivo con diseño observacional.

### MUESTRAS FECALES

Se trabajó con 65 muestras fecales humanas positivas a *Giardia* spp. procedentes de tres hospitales de referencia nacional en Lima-Perú (Hospital Arzobispo Loayza, Hospital Cayetano Heredia y Hospital Nacional Sergio E. Bernales), obtenidas por muestreo de tipo no probabilístico intencionado durante el periodo de agosto 2017 a febrero de 2018. El criterio de inclusión para las muestras fue la presencia del parásito *Giardia* spp. en una carga parasitaria promedio de dos a cinco quistes por campo microscópico; asimismo, no deberían contener ningún fijador parasitológico. Las muestras fueron transportadas en un cooler y confirmadas por microscopía en el Laboratorio de Referencia Nacional de Enteroparásitos del Instituto Nacional de Salud, mediante examen parasitológico directo, luego fueron almacenadas a 4 °C hasta su proceso.

Los quistes fueron purificados y concentrados por el método de gradiente de sucrosa de dos fases <sup>(12-14)</sup>. Las muestras de heces fueron emulsionadas con agua destilada y filtradas con gasa; previamente a un tubo de vidrio 16 x100 mm se colocó 3 mL de sucrosa 0,85 M, al que se le agregó igual volumen de la suspensión fecal y se centrifugó a 2300 rpm por cinco minutos; luego, se recuperó la fase sucrosa-agua y se realizaron tres lavados con agua destilada centrifugando a las mismas revoluciones descritas. Posteriormente, se preparó un tubo con gradiente de sucrosa 0,85 M a 0,4 M al que se le agregó cuidadosamente el sedimento

lavado y se centrifugó a 2300 rpm durante diez minutos a 4 °C. Finalmente, los quistes purificados colectados de la interfase se lavaron nuevamente para eliminar la sucrosa y fueron resuspendidos en agua destilada siendo almacenados a -20 °C hasta ser procesados.

#### MUESTRAS DE CULTIVO

Se trabajó con un cultivo *in vitro* de *Giardia intestinalis* (ATCC® 30957™) obtenido de fase exponencial en medio TYI-S-33 modificado (Tripticasa, extracto de levadura, hierro y suero) enriquecido con suero bovino fetal (10%) basados en el método descrito por Keister <sup>(15)</sup>, el cual permite un desarrollo adecuado del parásito.

Para lograr el desprendimiento de los mismos de la superficie del tubo, a los cultivos se les sometió a un baño de hielo por diez minutos, posteriormente diez inversiones y frotación entre las palmas de las manos, siendo luego centrifugados a 2500 rpm por cinco minutos a 4 °C. Asimismo, para estimar la carga parasitaria se empleó el recuento en cámara Neubauer. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta ser procesadas.

#### EXTRACCIÓN DE ADN DE QUISTES

El ADN de los quistes fue extraído usando 11 métodos de extracción como se observa en la Tabla 1. Cada método tiene un pretratamiento o la combinación de estos. Los pretratamientos fueron físicos: choque térmico, con ciclos

**Tabla 1.** Métodos de extracción de ADN de *Giardia* spp. a partir de quistes.

Métodos	Descripción
Método I	Pretratamiento mecánico 1: Uso de perlas de vidrio. Pretratamiento enzimático 1: Incubar con el búfer de lisis E (100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 100 mM EDTA, 2% SDS, 1 mM mercaptoetanol) y búfer GTP (5 mM tiocianato de guanidina, 50 mM tris-HCl, 50% fenol). Pretratamiento choque térmico 1: (100 °C - -20 °C) por 30 minutos / una hora (1 ciclo) y cinco minutos (1 ciclo). Extracción: Kit comercial Stool DNA Isolation de Norgen.
Método II	Pretratamiento enzimático 1: Incubar con el búfer de lisis E (100 mM tris-HCl, 200 mM NaCl, 1%, 100 mM EDTA, 2% SDS, 1 mM mercaptoetanol) y búfer GTP (5 mM tiocianato de guanidina, 50 mM tris-HCl, 50% fenol). Extracción: Kit comercial Stool DNA Isolation de Norgen.
Método III <sup>(18)</sup>	Pretratamiento mecánico 1: Uso de perlas de vidrio. Pretratamiento choque térmico 2: (100 °C - nitrógeno líquido) por tres minutos repetidos en seis ciclos. Extracción: Kit comercial Stool DNA Isolation de Norgen.
Método IV	Pretratamiento choque térmico 2: (100 °C - nitrógeno líquido) por tres minutos repetidos en seis ciclos. Pretratamiento enzimático 1: Incubar con el búfer de lisis E (100 mM tris-HCl, 200 mM NaCl, 100 mM EDTA, 2% SDS, 1 mM Mercaptoetanol) - búfer GTP (5 mM tiocianato de guanidina, 50 mM tris-HCl, 50% fenol). Pretratamiento enzimático 2: Incubar con proteinasa K toda la noche. Extracción: Kit comercial Stool DNA Isolation de Norgen.
Método V	Pretratamiento choque térmico 2: (100 °C - nitrógeno líquido) por tres minutos repetidos en seis ciclos. Pretratamiento enzimático 3: Incubar con el búfer tritón (50 mM tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% tritón X-100, 5 mM EDTA) - búfer GTP (5 mM tiocianato de guanidina, 50 mM tris-HCl, 50% fenol). Extracción: Kit comercial Stool DNA Isolation de Norgen.
Método VI <sup>(19)</sup>	Pretratamiento choque térmico 2: (100 °C - nitrógeno líquido) por dos minutos repetidos en tres ciclos. Pretratamiento enzimático 2: Incubar con proteinasa K 56 °C toda la noche. Extracción: Kit comercial PureLink Genomic DNA para tejidos de Invitrogen.
Método VII <sup>(20)</sup>	Pretratamiento enzimático 4: Incubar con búfer de lisis 3 (1 M tris-HCl, 1 % tritón X-100, 0,5 M EDTA, 2% SDS, 0,2 N NaOH, 1 mM mercaptoetanol) y búfer GTP (5 mM tiocianato de guanidina, 50 mM tris-HCl, 50% fenol). Pretratamiento choque térmico 1: (100 °C a -20 °C) por 30 minutos/1hora (1 ciclo) y cinco minutos (1 ciclo). Extracción: <i>In house</i> , fenol - cloroformo - alcohol isoamílico.
Método VIII <sup>(21)</sup>	Pretratamiento mecánico 1: Uso de perlas de vidrio. Pretratamiento enzimático 5: Incubar con búfer de lisis TE (50 mM tris-HCl, 50 mM EDTA). Pretratamiento choque térmico 3: (100 °C - nitrógeno líquido) por tres minutos repetidos en ocho ciclos. Pretratamiento enzimático 6: Proteinasa K-SDS 1 M 55 °C por cuatro horas. Extracción: Kit comercial QIA amp DNA Stool de Qiagen.
Método IX	Extracción: Kit comercial Stool DNA Isolation de Norgen. A: Ningún pretratamiento. B: Pretratamiento choque térmico 3: (100 °C - nitrógeno líquido) por tres minutos repetidos en ocho ciclos.
Método X	Extracción: Kit comercial QIA amp DNA Stool de Qiagen. A: Ningún pretratamiento. B: Pretratamiento choque térmico 3: (100 °C - nitrógeno líquido) por tres minutos repetidos en ocho ciclos.
Método XI <sup>(22)</sup>	Pretratamiento choque térmico 3: (100 °C - nitrógeno líquido) por tres minutos repetidos en ocho ciclos. Pretratamiento enzimático 7: Búfer de lisis (50 mM tris-HCl, 25 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1% SDS, 100 ug/mL de proteinasa K) incubar a 56 °C por dos horas. Extracción: <i>In house</i> , fenol - cloroformo - alcohol isoamílico.

repetitivos de calentamiento (agua a 100 °C) y enfriamiento (nitrógeno líquido a -196 °C o -20 °C); enzimáticos, con incubación en diferentes búfer de lisis: búfer 3, búfer E, búfer tritón, búfer GTP e incubación con proteinasa K a diferentes tiempos; y mecánicos, con el uso de perlas de vidrio inmersas en búfer de lisis.

Posteriormente a los pretratamientos el aislamiento del ADN se realizó con el uso de kits comerciales, Stool DNA Isolation de Norgen, QIAamp DNA Stool de Qiagen, PureLink Genomic DNA de Invitrogen; y con aplicación del método tradicional de fenol-cloroformo. Las muestras de ADN extraídas fueron almacenadas a -20 °C.

#### EXTRACCIÓN DE ADN DE TROFOZOÍTOS

El ADN de los trofozoítos fue extraído usando seis métodos de extracción como se observa en la Tabla 2.

Los pretratamientos fueron físicos: choque térmico, con ciclos repetitivos de calentamiento (agua a 100 °C) y enfriamiento (nitrógeno líquido a -196 °C); enzimáticos con incubación de búfer de lisis E a diferentes concentraciones de proteinasa K. Posteriormente, se realizó la extracción con el kit PureLink Genomic DNA de Invitrogen. Las muestras de ADN extraídas fueron almacenadas a -20 °C.

#### CUANTIFICACIÓN DE ADN

La concentración y pureza de las muestras de ADN extraídas se midió mediante espectrofotometría. Las muestras fueron cuantificadas en una lectora EON Gen5 versión 2.04.11 (BioTek), cuyo coeficiente de extinción fue 0,020 (µg/mL)<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> y la calidad del ADN se evaluó por la proporción entre las absorbancias 260 nm / 280 nm para cada método.

#### AMPLIFICACIÓN DEL PCR SEMIANIDADA

La región del gen glutamato deshidrogenasa (gdh) fue amplificada según Read (16). El método incluye las

secuencias de los cebadores *Internal Forward Primer* GDHiF: CAG TAC AAC TCY GCT CTC GG y *Reverse Primer* GDHiR: GTT RTC CTT GCA CAT CTC C para el producto del PCR 1, mientras que para el PCR 2 el *External Forward Primer* fue GDHeF: TCA ACCG TYA AYC GYG GYT TCC GT.

El volumen total de la reacción fue 25 µL, contenía 1X PCR búfer con Mg<sup>+</sup>; 0,2 mM de dNTP; 0,2 µM de cada cebador, 0,1 U/µL de la enzima TAQ HotStart DNA y 3 µL de ADN. Las muestras fueron sujetas a una desnaturalización inicial a 94 °C por tres minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, hibridación a 56 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por un minuto, terminando con una extensión final de a 72°C por cinco minutos.

En el caso del gen beta giardina las condiciones de amplificación fueron las descritas por Caccio (17). Los cebadores del PCR 1 fueron el primer *forward* G7: AAG CCC GAC GAC CTC ACC CGC AGT GC y el primer *reverse* G759: GAG GCC GCC CTG GAT CTT CGA GAC GAC y el *forward* para el PCR 2 fue el G376: GAT AAC GAC GCC ATC GCG GCT CTC AGG AA. El volumen total de la reacción y las concentraciones de reactivos fue igual al empleado en el gen gdh. Las muestras fueron sujetas a 35 ciclos 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos y 72 °C por un minuto con una extensión final a 72 °C por cinco minutos.

Ambas reacciones fueron realizadas en el Termociclador MultiGene OptiMax Thermal Cycler version 1.1. El control negativo fue agua estéril y el control positivo de ADN genómico la cepa *Giardia intestinalis* (Lambl) Alexeieff (ATCC® 30888D™). Los productos del PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con colorante fluorescente Safe green ABM a 70V por 60 minutos.

**Tabla 2.** Métodos de extracción de ADN de *Giardia* spp. a partir de trofozoítos.

Métodos	Descripción
Método I	Kit comercial PureLink Genomic DNA de Invitrogen.
Método II (7,23)	Pretratamiento enzimático 8: Incubar con el búfer de lisis E (Tris-HCl 100 Mm, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0,2 M, mercaptoetanol 1 mM, proteinasa K (100µg/mL). Extracción: Kit comercial PureLink Genomic DNA de Invitrogen.
Método III (7)	Pretratamiento enzimático 9: Incubar con el búfer de lisis E (Tris-HCl 100 Mm, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0,2 M, mercaptoetanol 1 mM, proteinasa K (1 mg/mL). Extracción: Kit comercial PureLink Genomic DNA de Invitrogen.
Método IV (7)	Pretratamiento enzimático 10: Incubar con el búfer de lisis E (Tris-HCl 100 Mm, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0,2M, mercaptoetanol 1 mM, proteinasa K (20 mg/mL). Extracción: Kit comercial PureLink Genomic DNA de Invitrogen.
Método V (7)	Pretratamiento enzimático 8: Incubar con el búfer de lisis E (Tris-HCl 100 Mm, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0,2 M, mercaptoetanol 1 mM, proteinasa K (100 µg/mL). Pretratamiento enzimático 11: Incubar con proteinasa K (20 mg/mL). Extracción: Kit comercial PureLink Genomic DNA de Invitrogen.
Método VI	Pretratamiento choque térmico 4: (100 °C - nitrógeno líquido) por cuatro ciclos. Extracción: Kit comercial PureLink Genomic DNA de Invitrogen.

**ANÁLISIS DE DATOS**

Para evaluar las diferencias en las concentraciones de ADN obtenidas de la cuantificación de los diferentes métodos de extracción se utilizó el análisis de varianza ANOVA con el estadístico HSD Tukey con un intervalo de confianza de 95% y un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo. Los datos fueron procesados empleando el software IBM SPSS Statistics para Windows, versión 23 (IBM Corp., Armonk, N.Y., USA).

**CONSIDERACIONES ÉTICAS**

La aprobación ética para este estudio fue otorgada por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) del Instituto Nacional de Salud de acuerdo con las normas éticas para la autorización de uso de material biológico para las investigaciones del Centro Nacional de Salud Pública.

**RESULTADOS**

**EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN DE QUISTES**

Se analizaron 65 muestras de quistes de *Giardia* spp. con una carga parasitaria promedio de  $5 \times 10^4$  quistes por muestra, realizando cinco extracciones por método evaluado. Inicialmente, se trabajó con metodologías referenciadas como es el caso de los métodos III, VI, VII, VIII y XI sin obtener resultados satisfactorios; motivo por el que se realizaron modificaciones a las metodologías, proponiendo los métodos I, II, IV, V, IX y X descritos en la Tabla 1.

Los pretratamientos enzimáticos evaluados fueron siete, los que incluían búfer de lisis con detergentes iónicos, como el SDS, no iónicos como el tritón X-100, agentes reductores como el mercaptoetanol, agentes caotrópicos como el tiocianato de guanidina, entre otros, teniendo mejor desempeño el pretratamiento E1 (método I, II y IV) al lograr el éxito en la amplificación del marcador bg (100% de amplificación). Asimismo, el pretratamiento mecánico con el uso perlas de vidrio en los métodos I y III fue combinado con pretratamientos de choque térmico para ayudar a romper la pared quística logrando la amplificación del marcador bg en 100% de las muestras.

Con respecto a la concentración de ADN, el método I permitió extraer la mayor cantidad de ácidos nucleicos (12,24 ng/μL), seguido de los métodos V, VII y II (11,67; 10,4 y 8,87 ng/μL), cabe resaltar que el método I mostró diferencias significativas comparado a los métodos II ( $p=0,039$ ), III-IV, VI y IX ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, la pureza del ADN extraído de las muestras fue variable, no encontrando diferencias significativas entre los métodos comparados, mostrando que los 11 métodos evaluados no obtuvieron una calificación de pureza óptima para la relación de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$ , ya que los valores obtenidos estaban entre 1,2 y 1,4 (métodos I-VII y IX), evidenciándose una presencia elevada de compuestos aromáticos; mientras que los métodos VIII, X y XI tenían un rango de 3,09-3,65; lo que indica una alta contaminación con RNA (Tabla 3).

Sin embargo, la variable de interés fue el éxito en la amplificación para evaluar el rendimiento de los métodos,

**Tabla 3.** Comparación de concentración y calidad de ADN (ng/μL) generados por los diferentes métodos de extracción de ADN de *Giardia* spp. a partir de quistes.

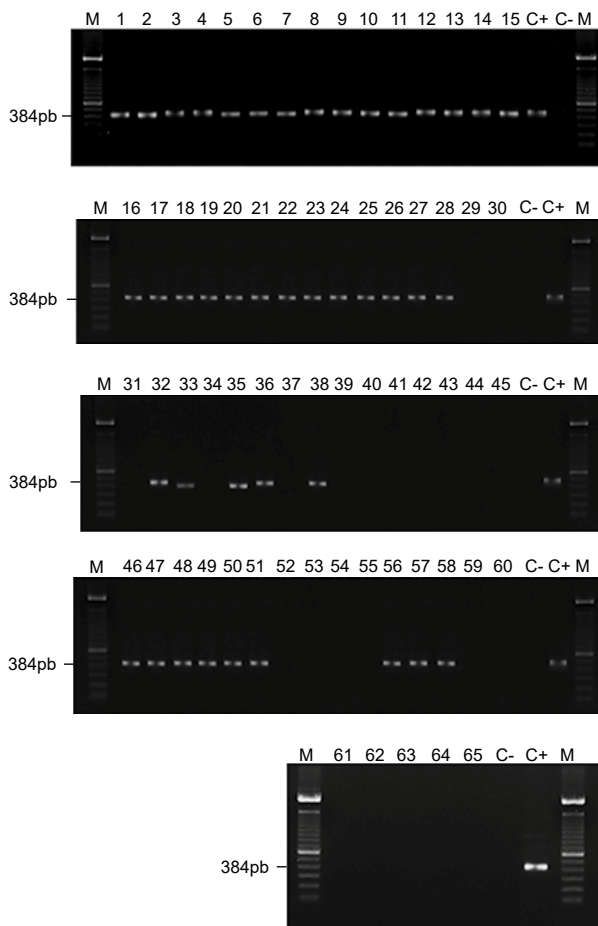
Tipo de pretratamiento	Métodos	Concentración de ADN (ng/μL)		Valor de p*	Calidad de ADN ( $A_{260}/A_{280}$ )		Valor de p*	Amplificación bg gdh	
		Media	DE		Media	DE		%	%
M+ST1 +E1	I	12,24	1,56	<0,001	1,40	0,06	1,000	100	60
E1	II	8,87	3,04	0,039	1,30	0,12	0,885	100	40
M+ST2	III	4,17	0,95	<0,001	1,35	0,15	1,000	100	0
ST2 +E1+E2	IV	5,28	1,26	<0,001	1,32	0,14	0,995	100	0
ST2 +E3	V	11,67	1,21	1,000	1,29	0,06	0,975	100	0
ST2+E2	VI	2,99	0,22	<0,001	1,20	0,21	0,409	60	40
E4+ST1	VII	10,40	0,90	0,831	1,39	0,07	1,000	60	0
M+ST3+ E5+E6	VIII	5,87	0,43	SR	3,09	0,45	SR	40	20
Ninguno	IXA	4,84	1,60	<0,001	1,32	0,13	0,994	0	0
ST3	IXB	6,32	1,03	<0,001	1,33	0,11	0,994	100	20
Ninguno	XA	4,58	0,29	SR	3,50	0,50	SR	20	0
ST3	XB	4,86	0,32	SR	3,14	0,50	SR	60	20
ST3 + E7	XI	96,58	3,02	SR	3,65	0,48	SR	0	0

ST1: pretratamiento choque térmico 1; ST2: pretratamiento choque térmico 2; ST3: pretratamiento choque térmico 3; E1: pretratamiento enzimático 1; E2: pretratamiento enzimático 2; E3: pretratamiento enzimático 3; E4: pretratamiento enzimático 4; E5: pretratamiento enzimático 5; E6: pretratamiento enzimático 6; E7: pretratamiento enzimático 7; ng/μL: nanogramo por microlitro;  $A_{260}/A_{280}$ : relación de absorbancias 260 y 280; bg: gen de beta giardina; gdh: gen de glutamato deshidrogenasa; DE: desviación estándar; SR: sin resultado de valor de p al haberse excluido del análisis por la baja calidad de ADN.

\*Prueba HSD Tukey de la comparación de los métodos evaluados con el método I (mejor rendimiento).

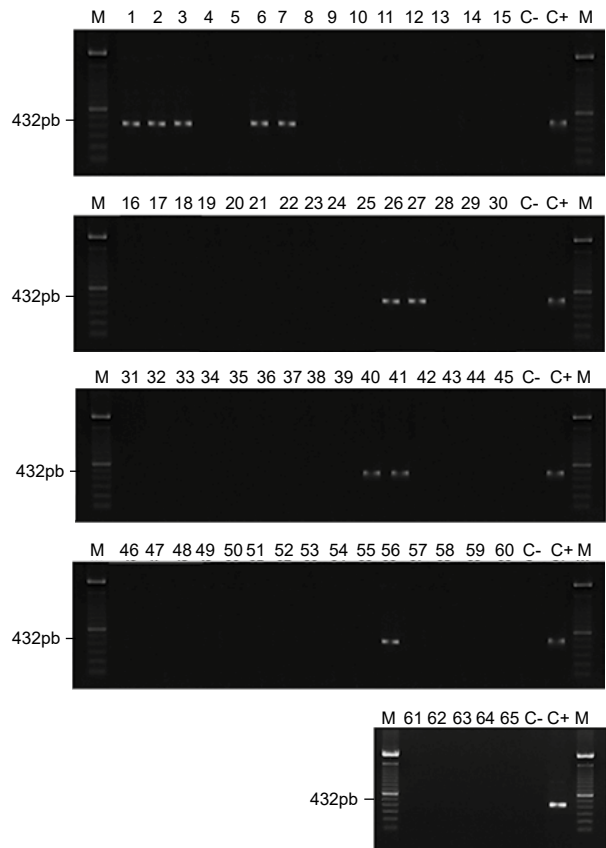
observando que al realizar la amplificación por PCR semianidada, se evidenció que 100% de las muestras fueron detectadas con el marcador bg cuando se empleó los métodos I-V, IXB que incluían un pretratamiento con choque térmico, excepto en el método II; y extracción con el kit comercial STOOL DNA Isolation de Norgen, verificado con la visualización de banda de 384 pb (PCR2) en la electroforesis (Figura 1). En el caso del marcador gdh, al aplicar los métodos I,II y VI se logró amplificar entre 40 y 60% de las muestras, estas metodologías incluían al menos un pretratamiento enzimático y extracción con el kit comercial STOOL DNA Isolation de Norgen verificado con la visualización de banda de 432 pb (PCR2) (Figura 2).

Al evaluar la extracción sin aplicación de pretratamientos a la muestra, se extrajo escasa cantidad de ADN, inferior a 4,8 ng/ $\mu$ L, siendo el éxito de amplificación mínimo; sólo el 20% para el marcador bg y nulo para gdh; lo que fue



**Figura 1.** Electroforesis en agarosa al 2% de productos de PCR semianidada para el gen beta giardina (384 pb) extraído de quistes de *Giardia spp.*

Línea 1-5 (método I); 6-10 (método II); 11-15 (método III); 16-20 (método IV); 21-25 (método V); 26-30 (método VI); 31-35 (método VII); 36-40 (método VIII); 41-45 (método IXA); 46-50 (método IXB); 51-55 (método XA); 56-60 (método XB); 61-65 (método XI); C+: control positivo; C-: control negativo; M: Marcador de 100 pb.



**Figura 2.** Electroforesis en agarosa al 2% de productos de PCR semianidada para el gen glutamato deshidrogenasa (432 pb) extraído de quistes de *Giardia spp.*

Línea 1-5 (método I); 6-10 (método II); 11-15 (método III); 16-20 (método IV); 21-25 (método V); 26-30 (método VI); 31-35 (método VII); 36-40 (método VIII); 41-45 (método IXA); 46-50 (método IXB); 51-55 (método XA); 56-60 (método XB); 61-65 (método XI); C+: control positivo; C-: control negativo; M: Marcador de 100 pb.

evidenciado en los métodos IXA y XA; cabe resaltar que aplicar un pretratamiento de choque térmico (ST3) mejoró ligeramente los resultados, el kit comercial STOOL DNA Isolation de Norgen mostró mejor rendimiento, mientras que el uso de un método de extracción *in house* con solventes orgánicos no mostró buen rendimiento.

Los resultados indican que el gen bg presentó alto rendimiento en la detección de ADN parasitario extraído de quiste, amplificando al 100% de las muestras en al menos seis métodos y presentando mayor intensidad en las bandas de electroforesis (Figura 1); en comparación al marcador gdh, que alcanzó 60 % de detección al emplear el método I, observando bandas más tenues (Figura 2).

**EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN DE TROFOZOÍTOS**

Se analizaron muestras de trofozoítos de *Giardia intestinalis* (ATCC® 30957™) con una carga parasitaria promedio de

**Tabla 4.** Comparaciones múltiples de acuerdo a la concentración y calidad de ADN generados por los diferentes métodos de extracción de ADN de *Giardia* spp. a partir de trofozoítos

Tipo de pretratamiento	Métodos comparados		Concentración de ADN (ng/μL)		Valor de p*	Calidad de ADN ( $A_{260}/A_{280}$ )		Valor de p*
			Media	DE		Media	DE	
Ninguno	I	II	4,51	2,05	<0,001	1,60	0,09	0,787
		III	2,55	0,93	<0,001	1,83	0,17	0,998
		IV	3,59	3,78	<0,001	1,76	0,41	0,989
		V	6,93	4,68	<0,001	1,67	0,16	0,820
		VI	7,37	5,24	<0,001	1,73	0,19	0,966
		E8	II	I	26,56	5,73	<0,001	1,85
E8	II	III	2,55	0,93	0,982	1,83	0,17	0,952
		IV	3,59	3,78	1,000	1,76	0,41	0,983
		V	6,93	4,68	0,937	1,67	0,16	1,000
		VI	7,37	5,24	0,787	1,73	0,19	0,996
		E9	III	IV	3,59	3,78	0,996	1,76
E9	III	V	6,93	4,68	1,000	1,67	0,16	0,965
		VI	7,37	5,24	0,386	1,73	0,19	0,965
		E10	IV	V	6,93	4,68	0,974	1,67
E10	IV	VI	7,37	5,24	0,687	1,73	0,19	1,000
		E8+E11	V	VI	7,37	5,24	0,269	1,73
ST4	VI	I	26,56	5,73	<0,001	1,85	0,03	0,787

ST4: pretratamiento choque térmico 4; E8: pretratamiento enzimático 8; E9: pretratamiento enzimático 9; E10: pretratamiento enzimático 10; E11: pretratamiento enzimático 11; ng/μL: nanogramo por microlitro;  $A_{260}/A_{280}$ : relación de absorbancias 260 y 280; bg: gen de beta giardina; gdh: gen de glutamato deshidrogenasa; n: número de muestras analizadas; DE: desviación estándar.

\*Prueba HSD Tukey

5x10<sup>6</sup> trofozoítos por muestra. En relación a la concentración del ADN extraído, según las pruebas de ANOVA y de Tukey existe diferencia significativa entre los métodos evaluados ( $p < 0,05$ ), el método I extrajo mayor cantidad de ADN somático (26,56 ng/μL;  $p < 0,001$ ) comparado a los otros métodos (Tabla 4). Asimismo, en relación a la calidad de las muestras de ADN extraídas, se evidenció que los métodos I y III presentan valores de pureza óptima (relación  $A_{260}/A_{280}$  de 1,83-1,85) y los métodos II, IV-VI pureza aceptable (1,60-1,76). Cabe resaltar que no existió diferencia significativa al comparar la calidad de ADN entre las metodologías. Asimismo, al evaluar los marcadores moleculares ambos presentaron alto rendimiento 100% de amplificación.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se compararon diferentes metodologías de extracción de ácidos nucleicos de *Giardia* spp., los resultados de las concentraciones de ADN obtenidas de la fase quística indican que con la aplicación de tres pretratamientos previos a la extracción del kit comercial Stool DNA Isolation de Norgen, descritos en el método I, se puede obtener una concentración de ADN de 12,24 ng/μL con pureza de 1,4 y lograr un alto

rendimiento en la detección molecular de *Giardia* spp. al usar el marcador bg (100% de amplificación) y con gdh (60%), en comparación a los otros métodos evaluados; cabe resaltar que esta combinación se basó en los métodos de Adamska<sup>(19)</sup>, Rojas<sup>(20)</sup>, Babaei<sup>(21)</sup> y Molina<sup>(24)</sup>. Con respecto a la evaluación de métodos de extracción de trofozoítos indicamos que al someter a las muestras a pretratamientos (Métodos II-VI) no se logró mejorar la extracción de ADN somático del parásito, más bien se tuvo baja recuperación, contrario a lo reportado por Molina *et al.*<sup>(7)</sup>, cabe resaltar que en todos los casos la calidad de ADN fue óptima, motivo por el que no se sugiere realizar pretratamientos para este estadio evolutivo de *Giardia* spp. ya que reduce significativamente la extracción de ADN parasitario.

La tipificación molecular de agentes etiológicos es una prioridad en los laboratorios de salud pública, debido a las implicancias en abordaje terapéutico y distribución epidemiológica; los protocolos de extracción de ácidos nucleicos son variables dependiendo del tipo de muestra y del organismo a estudiar, sobre todo en los parásitos que presentan diferentes estadios evolutivos, por lo que es importante la elección de un método de extracción de alto rendimiento que sea sencillo, rápido y reproducible. Los

genes de la enzima glutamato deshidrogenasa-gdh<sup>(16,25,26)</sup> y de la beta giardina-bg<sup>(10,17,27)</sup> han sido ampliamente usados demostrando gran especificidad para la caracterización molecular de *Giardia* spp., razón por la que se emplearon para el rendimiento de los métodos evaluados.

La literatura reporta que es necesario separar los quistes de los detritos presentes en las muestras fecales empleando el método de concentración por gradiente de sucrosa de dos fases<sup>(12-14)</sup>, para reducir la posible inhibición de la PCR ocasionada por los componentes de las muestras coprológicas como las sales biliares, proteínas, hemoglobina, lactoferrina, inmunoglobulinas, entre otros<sup>(9)</sup>, y obtener ADN intacto para obtener métodos comparables. Otro punto importante, es eliminar las sustancias derivadas de los procesos de extracción, que según los estudios el uso de columnas procedentes de kits comerciales facilita la purificación de ADN, disminuyendo la presencia de inhibidores químicos, alcanzando mayores tasas de amplificación a las obtenidas empleando una metodología convencional basada en fenol/cloroformo<sup>(8,21)</sup>. En este estudio se evidenció la inhibición de la detección del gen gdh y bg al evaluar los métodos VII y XI<sup>(22)</sup>, cuyo proceso de extracción fue con el método *in house*, este último método presentó baja calidad de ADN (3,65 de relación  $A_{260}/A_{280}$ ) con presencia de alta contaminación.

Por otro lado, al ejecutar los métodos IXA y XA, usando sólo kits comerciales, Stool DNA Isolation de Norgen y el QIAAmp DNA STOOL de Qiagen sin pretratamientos, se encontraron valores promedio de calidad y concentración de ADN de 1,32 / 4,84 ng/ $\mu$ L y 3,5 / 4,58 ng/ $\mu$ L, respectivamente, sin éxito en la amplificación para los marcadores estudiados, por lo que es necesario aplicar protocolos de pretratamiento a las muestras. Asimismo, se encontró que realizar un sólo pretratamiento de choque térmico (métodos IXB y XB) resultó insuficiente para lograr la amplificación de más del 20% del marcador gdh. En concordancia a lo reportado por Sepahvand *et al.*<sup>(18)</sup>; quienes sugieren el uso de perlas de vidrio, para producir un efecto mecánico y mejorar la eficiencia del protocolo de extracción para recuperar mayor cantidad de ADN. Esto se evaluó al aplicar el método III, recuperando 4,17 ng/ $\mu$ L de ADN logrando una amplificación del 100% de las muestras para el marcador bg, pero con dificultades para detectar el marcador gdh, motivo por el que se consideró que es importante adicionar algún pretratamiento enzimático para mejorar la recuperación de ácidos nucleicos.

La evaluación del método II, con sólo un pretratamiento enzimático, mostró una concentración de ADN de 8,87 ng/ $\mu$ L y una detección del 100% del marcador bg y 40% del gdh; el método IV, incluyó adicionalmente un pretratamiento de choque térmico y degradación enzimática por dos búfer de lisis (E-GTP) y la acción de la proteinasa K, amplificando solo al marcador bg; del mismo modo, se evaluó la

acción del búfer tritón y se aplicó el método V obteniendo resultados similares al método IV.

En la mayoría de estudios previos, no se han mostrado protocolos de extracción con datos específicos de concentración de ADN extraído y resultados de medición por PCR, siendo importante conocer esta correlación. Al realizar el método VI se llevó a cabo la metodología de Adamska *et al.*<sup>(19)</sup>, quienes realizan pretratamientos de choque térmico (tres ciclos), enzimáticos (proteinasa K) y extracción con kit comercial reportando alta detección del gen bg por PCR. Del mismo modo, Molina *et al.*<sup>(24)</sup>; informan un 79% - 80% de detección molecular por PCR detectando desde 15 quistes/ $\mu$ L, sin embargo, los resultados de este estudio no fueron comparables, alcanzando concentraciones de ADN <2,9 ng/ $\mu$ L y detección del gen bg sólo en 60% de las extracciones.

Otras metodologías incluían múltiples pretratamientos enzimáticos (búfer de lisis TE y proteinasa K), mecánicos (con perlas de vidrio) y de choque térmico como lo muestra Babei *et al.*<sup>(22)</sup>; este protocolo fue evaluado en el método VIII recuperando 5,87 ng/ $\mu$ L de ADN logrando una amplificación de 40% y 20% para los marcadores bg y gdh, respectivamente. Este método no fue práctico ya que involucraba muchos pretratamientos de choque térmico (ocho ciclos con nitrógeno líquido) y requería el uso de proteinasa K, que es un insumo costoso. Sin embargo, el pretratamiento mecánico con el uso de perlas de vidrio fue una alternativa adecuada.

En nuestro país, Rojas en 2014<sup>(20)</sup>, utilizó dos pretratamientos enzimáticos, el búfer de lisis 3 y el búfer GTP como alternativa al uso de proteinasa K y extracción con el método convencional reportando alta concentración y pureza de ADN (2156,2 ng/ $\mu$ L; 1,79-2,04), pero bajo porcentaje de amplificación al marcador bg (13,3%). No obstante, al evaluar el método VII no se logró obtener las grandes cantidades de ADN que reportó el autor, a pesar de usar mayor cantidad de quistes ( $5 \times 10^4$  quistes/muestra); adicionalmente, el porcentaje de amplificación fue de 60% para el gen bg y nulo para gdh, posiblemente atribuido a la metodología de extracción. En vista de los resultados obtenidos por las investigaciones previas, para aumentar el número de muestras amplificadas se propuso combinar diferentes pretratamientos incluyendo el mecánico, enzimático y de choque térmico.

Una de las limitaciones del estudio fue no incluir mayor número de muestras por cada método evaluado, a fin de mejorar la potencia estadística. Además, al comparar cargas parasitarias de diferentes pacientes existe el sesgo de no homogeneidad en las muestras. No obstante, para disminuir este sesgo se trabajó con la misma cantidad de quistes por método; consideramos que los resultados de este estudio son importantes, ya que evidencian que es posible extraer ADN de la fase quística del parásito a fin de



llevar futuros estudios de genotipificación de cepas nativas en el país, y es el punto de inicio para determinar límites de detección de *Giardia* spp. para diferentes marcadores moleculares, y ser utilizados a partir de muestras coprológicas e implementar el diagnóstico molecular de esta parasitosis.

Se concluye que el método que obtiene los mejores resultados para la extracción de ácidos nucleicos a partir de quistes de *Giardia* spp. incluye la aplicación de tres pretratamientos: mecánicos, enzimáticos y de choque térmico; siendo el marcador molecular bg de mejor rendimiento para el estadio de quiste. Por su parte, el estadio de trofozoito no requiere pretratamiento. Los resultados de este estudio permiten contar con una metodología reproducible para la detección molecular del parásito *Giardia* spp. en cualquier estadio evolutivo para posteriores estudios de genotipificación y/o resistencia parasitaria.

**Contribuciones de los autores:** KTT participó en la concepción, diseño del artículo, análisis e interpretación de resultados. JSM realizó los experimentos y análisis de resultados; SZV participó en la colecta de muestras y realización de base de datos; MBF y EMH participaron en el diseño del artículo e interpretación de resultados. Todos participaron en la redacción del artículo y aprobaron la versión final.

**Agradecimientos:** Agradecemos a los laboratorios de parasitología de los hospitales nacionales y a los laboratorios de referencia nacional por el apoyo en la realización del presente proyecto.

**Fuentes de financiamiento:** La presente investigación fue financiada con recursos de Fondo Nacional de Ciencia y tecnología (FONDECYT), Convenio N° 136-2015 proyecto «Caracterización molecular de *Giardia* spp. y su relación con el perfil de resistencia en hospitales de referencia nacional de Lima-Perú».

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001;14(3):447-75. doi: 10.1128/CMR.14.3.447-475.2001
- Alparó I. Giardiasis y desnutrición. Rev Bol Ped 2005;44(3):166-173.
- Elliot A, Cáceres I. Introducción a la Parasitología Médica del Perú. 3ra ed. Lima: Martegraf; 1994.
- Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humanas. 5ta edición. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas; 2012.
- Miller KM, Sterling CR. Sensitivity of Nested PCR in the Detection of Low Numbers of *Giardia lamblia* cysts. Appl Environ Microbiol. 2007;73(18): 5949-50. doi: 10.1128/AEM.00668-07
- Molina N, Polverino D, Minvielle M, Basualdo J. PCR amplifications of the triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. Parasitol Latinoam Microbiol. 2007;49:5-10.
- Molina N, Polverino D, Minvielle M, Apezteguía M, Aguilar M, Basualdo J. Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. Parasitol Latinoam. 2006;61:133-137. doi: 10.4067/S0717-77122006000200006.
- Greenspoon S, Scarpetta M, Drayton M, Turek S. QIAamp Spin Columns as a Method of DNA Isolation for Forensic Casework. J Forensic Sci. 1998;43:1024-30.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. J Appl Microbiol. 2012;113:1014-1026. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Rodríguez V, Espinosa O, Carranza J, Duque S, Arévalo A, Clavijo J, Urrea D, Vallejo G. Genotipos de *Giardia duodenalis* en muestras de niños de las guarderías del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar y de perros en Ibagué, Colombia. Biomédica. 2014; 34:271-81. doi: 10.7705/biomedica.v34i2.1713.
- Polverino, D. Molina, N, Minvielle, M. Lozano, E., Basualdo, J. Técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp. Rev Argent Microbiol. 2006;36(3):97-100.
- Al-Tukhi MH, Al-Ahdal MN, Peters W. A simple method for excystation of *Giardia lamblia* cysts. Ann Trop Med Parasitol. 1991;85(4):427-31. doi: 10.1080/00034983.1991.11812587
- Hautus MA, Kortbee LM, Vetter JC, Laarman JJ. In vitro excystation and subsequent axenic growth of *Giardia lamblia*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82:858-61. doi: 10.1016/0035-9203(88)90019-3
- Tarqui Terrones K, Ramírez Carranza G, Beltrán Fabián, M. Evaluación de métodos de concentración y purificación de *Giardia* spp. A partir de muestras coprológicas. Rev. Peru Med Exp Salud Publica. 2019;36(2):275-80. doi: http://dx.doi.org/10.17843/rpmpsp.2019.362.4151.
- Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77(4):487-8. doi:10.1016/0035-9203(83)90120-7.
- Read CM, Monis PT, Thompson RC. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. Infect Genet Evol. 2004;4:125-30. doi:10.1016/j.meegid.2004.02.001.
- Caccio SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. Int J Parasitol. 2002;32: 1023-30. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00068-1
- Sepahvand A, Pestehchian N, Yousefi HA, Gharehbabá RP. Comparison and evaluation of four methods for extracting DNA from *Giardia duodenalis* cysts for PCR targeting the *tpi* gene. J Parasit Dis. 2017;41(1):263-7. doi: 10.1007/s12639-016-0790-5
- Adamska M, Leonska-Duniec A, Maciejewska A, Sawczuk M, Skotarczak, B. Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan Real Time PCR. Parasite. 2010;17:299-305. doi: 10.1051/parasite/2010174299.
- Rojas G. Evaluación de tres primeros para la detección molecular de *Giardia intestinalis* en muestras fecales humanas [Tesis de Licenciatura]. Lima, Perú: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.

21. Babaei Z., Oormazdi H., Rezaie S, Rezaeian M, Razmjou E. Giardia intestinalis: DNA extraction approaches to improve PCR results. *Exp Parasitol.* 2011;128(2):159-62. doi: 10.1016/j.exppara.2011.02.001.
22. Jerez Puebla LE, Núñez FA, Santos LP, Rivero LR, Silva IM, Valdés LA, et al. Molecular analysis of Giardia duodenalis isolates from symptomatic and asymptomatic children from La Habana, Cuba. *Parasite Epidemiol Control.* 2017;2(3):105-3. doi: 10.1016/j.parepi.2017.05.003.
23. Pelayo L, Fraga J, Núñez Fa, Mendoza D, Torres DR, Finlay CM. Genetic characterization by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of 18 isolates of Giardia lamblia obtained from day care children. *Exp Parasitol.* 2013;104(3-4):162-6. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2003.08.003>
24. Molina N. Epidemiología molecular de Giardia lamblia en comunidades urbanas y rurales de Buenos aires y Mendoza, Argentina [Tesis de Magister]. Buenos aires, Argentina: Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; 2009.
25. Bertrand I, Albertini L, Schwartzbrod J. Comparison of two target genes for detection and genotyping of Giardia lamblia in human feces by PCR and PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2005;43(12):5940-4. doi: 10.1128/JCM.43.12.5940-5944.2005
26. Asher AJ, Waldron LS, Power ML. Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of Giardia intestinalis in human faeces. *Parasitol Res.* 2012;110(2):853-8. doi: 10.1007/s00436-011-2565-3.
27. Uda-Shimoda CF, Colli CM, Pavanelli MF, Falavigna-Guilherme AL, Gomes ML. Simplified protocol for DNA extraction and amplification of 2 molecular markers to detect and type Giardia duodenalis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78(1):53-8. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.008.

**Correspondencia:** Kathia Mariela Tarqui Torrones.

Dirección: Jirón Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú.

Teléfono: 997033653

Email: kathiax@yahoo.com



**Inclusión social en salud: acercando el diagnóstico de dengue a las poblaciones afectadas**



**KIT PARA EL DIAGNÓSTICO DE DENGUE  
"TARIKI - DENGUE IgM"**



*Investigar para proteger la salud*