



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
"PROFA. OMAIRA FIGUEROA"
SEDE ARAGUA**



**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE *Giardia*
intestinalis EN MUESTRAS DE HECES**

**Trabajo de investigación presentado
como requisito para aprobar la
Asignatura por:**

**Br. Moreno María
Br. Moronta Mariangel**

Maracay, Noviembre 2023



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
"PROFA. OMAIRA FIGUEROA"
SEDE ARAGUA**



**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE *Giardia*
intestinalis EN MUESTRAS DE HECES**

**Trabajo de investigación presentado
como requisito para aprobar la
Asignatura por:**

**Br. Moreno María
Br. Moronta Mariangel**

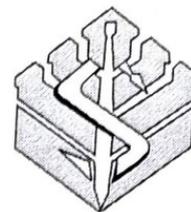
**Tutora científica:
Dra. Elizabeth Ferrer**

**Tutora metodológica:
Dra. Daria Camacho**

Maracay, Noviembre 2023



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANALISIS SEDE ARAGUA
PROFESORA "OMAIRA FIGUEROA"
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
ASIGNATURA: TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



VEREDICTO

Nosotros los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Trabajo de Investigación titulado: **“Estandarización de una PCR para la detección molecular de *Giardia intestinalis* en muestras de heces”** presentado por las bachilleres María Paula Moreno y Mariangel Moronta con el fin de aprobar la Asignatura Trabajo de Investigación; después de la exposición y discusión pública del citado trabajo, consideramos que el mismo reúne los requisitos para **APROBARLO** como tal. En fe de lo cual se levanta la presente acta, el día martes catorce del mes de noviembre del año dos mil veintitrés, dejando constancia de que, conforme a lo dispuesto por la normativa vigente, actuó como Coordinadora del jurado, la Tutora Metodológica Profesora Daria Camacho.

Por otra parte, se hace constar para efectos académicos de convalidación, que el presente trabajo representa el equivalente al Trabajo de Grado reconocido en otras instituciones y el contenido del veredicto es auténtico.

Elizabeth Ferrer

Prof. Elizabeth Ferrer
C.I.: 7.101.850
Tutor Científico

Narviz Pulido

Msc. Narviz Pulido
C.I.: 14741065
Jurado Evaluador

Daria Camacho

Prof. Daria Camacho
C.I.: 9.831.961
Coordinadora del Jurado





Universidad de Carabobo
 Facultad Ciencias de la Salud
 Escuela de Bioanálisis "Prof(a). Omaira Figueroa" Sede Aragua
 Departamento Clínico Integral
 Asignatura Trabajo de Investigación

XX JORNADAS DE INVESTIGACIÓN EN PREGRADO DE LA ESCUELA DE

BIOANÁLISIS

“Profesora Margarita Navas”

Dtorgan:

**MENCIÓN HONORÍFICA EN SU
 SEGUNDA CLASE**

AL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TITULADO:

**“Estandarización de una PCR para la detección molecular de
 Giardia intestinalis en muestras de heces”**

**Realizado por: María Paula Moreno y Mariangel Moronta
 Tutora científica: Elizabeth Ferrer**



DIPISA - FCSSA

Prof. José Corrado



Decano de la Facultad de
 Ciencias de la Salud

Prof. Dayanys Raquena S.



Directora de la Escuela de
 Bioanálisis Sede Aragua

Elizabeth Ferrer



Directora de Investigación y Producción
 Intelectual Sede Aragua

Prof. María F. Barbera



Coordinadora asignatura
 Trabajo de Investigación

Maracay, 13 al 15 de noviembre de 2023



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
"PROFA. OMAIRA FIGUEROA"
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**



Maracay, Noviembre 2023

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DEL TUTOR CIENTÍFICO

En mi carácter de Tutor Científico del Trabajo titulado: "Estandarización de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección molecular de *Giardia intestinalis* en muestras de heces" el cual es presentado por las bachilleres Maria Moreno y Mariangel Moronta, para aprobar la asignatura Trabajo de Investigación, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado designado.

Nombre y Apellido

Elizabeth Ferrer

CI: 7.101.850



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”
DEPARTAMENTO CLÍNICO INTEGRAL
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**



VEREDICTO

Nosotros, los abajo firmantes, miembros del jurado designado por el Consejo de Escuela de Bioanálisis, con el objeto de evaluar la Tesis de pregrado titulada, “Estandarización de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección molecular de *Giardia intestinalis* en muestras de heces” presentado por las bachilleras Maria Moreno C.I: 25.632.725 y Mariangel Moronta C.I: 26.320.145 con el fin de obtener el título de Licenciada en Bioanálisis. Después de la exposición y discusión pública del citado Trabajo de Investigación de pregrado, consideramos que el mismo reúne los requisitos para aprobarlo como tal. En fé de lo cual se levanta la presente acta a los ____ días del mes de _____ de _____, dejando constancia de que, conforme a lo dispuesto por la normativa vigente, actuó como Coordinadora del Jurado, la Tutora Metodológica Profa. _____.

**Nombres y apellidos
Cédula de Identidad
Tutora Científica**

**Nombres y apellidos
Cédula de Identidad
Jurado Evaluador**

**Nombres y apellidos
Cédula de Identidad
Coordinadora del Jurado**

DEDICATORIA

“Dedico este trabajo a mi familia, quienes fueron pilar fundamental durante este largo proceso, sin su amor, su apoyo y paciencia nada de esto hubiese sido posible. A Dios por bendecirme y guiarme durante este tiempo además de ponerme a las personas correctas en el camino. A mi querida profesora Elizabeth Ferrer, es un gran ejemplo de que con mucho esfuerzo, perseverancia y dedicación todo lo que uno se propone se puede lograr, y que desde el día uno nos lo demostró. A Mariangel Moronta, mi amiga y compañera de tesis, ya que desde el primer día de clases siempre estuvo allí para mí apoyándome, brindándome su amistad y cariño en este largo camino que compartimos juntas. Gracias a todos los que pusieron un granito de arena para que este trabajo fuese posible y gracias Universidad de Carabobo por brindarme las mejores experiencias!”

María Paula Moreno

Dedico este trabajo y mi más profundo agradecimiento a Dios quien siempre ha sido la guía en cada paso de mi vida sin el nada es posible, A los mejores padres Merly y Ángel por estar día y noche recargándome de ánimos, siempre brindándome su apoyo incondicional, paciencia y por creer y apostar tanto en mí, a mi hermano Anthony por estar presente en todo este tiempo, sin duda mi base es mi familia, este logro es por y para ustedes, mi mayor fortuna es poder alcanzar este gran sueño juntos. A mi querida y admirada profesora y maestra de la vida Elizabeth Ferrer por toda su dedicación constante en cada fase de este proceso, por su eterna humildad, profesionalismo y enseñanzas. A mi gran amiga Maria Paula Moreno por ser una excelente compañera, el éxito de los grandes proyectos siempre se logran trabajando en equipo y agradezco que fueras tú el mío, gracias por tanto amor eres maravillosa. Gracias a cada persona que ha estado involucrada y ha contribuido en mi crecimiento profesional y personal, la gratitud siempre permanecerá intacta, que Dios les retribuya con múltiples bendiciones.

Con amor Mariangel Moronta.

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios por sus bendiciones a lo largo de este camino.

A nuestros padres, y familia quienes nos apoyaron en todo momento.

A nuestra tutora científica, nuestra querida profesora, la Dra. Elizabeth Ferrer, por su entrega, esmero, paciencia dedicación y cariño, además de ser la guía en cada paso en la realización y ejecución de nuestro trabajo.

A nuestra querida tutora Dra. Daria Camacho por su paciencia, amor y dedicación.

A los licenciados Rousneidy Mujica y Henry Trosel, porque desde el inicio siempre estuvieron presentes y en disposición de apoyarnos y ayudarnos, para así avanzar en nuestro proyecto.

Le damos gracias al Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco J. Triana Alonso” y a todo el personal que allí labora, por ayudarnos y abrirnos sus puertas, para permitirnos desarrollar nuestro trabajo y poder así también expandir nuestros conocimientos.

A nuestra Alma Mater y casa de estudios, la Universidad de Carabobo, laboratorios involucrados, profesores, compañeros y amigos, por ser parte importante de este gran logro les damos las GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

	PP
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Tipo de investigación.....	10
Muestras biológicas.....	10
Métodos de extracción de ADN.....	11
Procedimiento experimental.....	12
Medida de la concentración, pureza e integridad del ADN.....	12
Electroforesis de ADN.....	12
Evaluación preliminar de las dianas de amplificación.....	12
Estandarización de las PCRs para la detección de la secuencia del gen 18S codificante del ARN ribosomal y de la Catepsina L de <i>Giardia intestinalis</i>	13
Determinación de la sensibilidad y la especificidad analíticas de la PCR.....	14
Amplificación de la secuencia del gen 18S codificante del ARN ribosomal de <i>Giardia intestinalis</i> en muestras de heces de pacientes.....	15
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE TABLAS

	PP
1 Muestras empleadas para la estandarización de la técnica PCR.....	11
2 Características de los cebadores para las diferentes dianas de amplificación de ADN por PCR para <i>Giardia intestinalis</i>	13
3 Condiciones elegidas para la estandarización de la PCR para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de <i>G. intestinalis</i>	27

LISTA DE FIGURAS

	PP
1 Integridad del ADN extraído de muestras confirmadas con <i>Giardia intestinalis</i>	16
2 Evaluación preliminar utilizando como diana Catepsina L.....	17
3 Evaluación preliminar utilizando como diana gen codificante del ADN ribosomal 18S.....	18
4 Evaluación preliminar diluciones de muestra de ADN para la amplificación del gen codificante del AN ribosomal 18S	19
5 Evaluación preliminar de muestras confirmadas con <i>Giardia intestinalis</i>	20
6 Evaluación preliminar de ADN extraído de muestras confirmadas con <i>Giardia intestinalis</i>	21
7 Concentraciones de MgCl ₂ para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de <i>Giardia intestinalis</i>	22
8 Concentraciones de dNTPs para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de <i>Giardia intestinalis</i>	22
9 Concentraciones de BSA para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de <i>Giardia intestinalis</i>	23
10 Concentraciones de cebadores para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de <i>Giardia intestinalis</i>	24
11 Concentraciones de la <i>Taq</i> Polimerasa para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de <i>Giardia intestinalis</i>	24
12 Estandarización de temperatura de hibridación.....	25
13 Estandarización de número de ciclos.	26
14 Determinación de sensibilidad de la técnica PCR para la amplificación del gen codificante de ARN ribosomal 18S de <i>G. intestinalis</i>	28

15	Determinación de especificidad de la técnica PCR para la amplificación del gen codificante de ARN ribosomal 18S de <i>G. intestinalis</i>	28
16	PCR identificación del ADN de <i>G. intestinalis</i> en muestras de heces de individuos infectados... ..	29

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA REACCIÓN EN CADENA DE LA
POLIMERASA PARA LA DETECCIÓN MOLECULAR DE *Giardia intestinalis* EN
MUESTRAS DE HECES

Bachilleres: María Moreno y Mariangel Moronta
Tutor Científico: Dra. Elizabeth Ferrer
Tutora Metodológica: Dra. Daria Camacho

RESUMEN

Las técnicas moleculares son una excelente alternativa para el diagnóstico de giardiasis, producida por *Giardia intestinalis*, pero se requiere evaluar y determinar la mejor diana de amplificación, condiciones óptimas de reactivos, así como la estandarización de un protocolo de PCR para su detección. El objetivo del presente trabajo se basó en la estandarización de una PCR para la detección molecular del parásito basándose en dos dianas de amplificación (Catepsina L y el gen codificante del ARN ribosomal 18S) y estandarización de la PCR donde se obtuvieron mejores resultados. Para la extracción de ADN se utilizó el estuche comercial de Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit a partir de muestras de heces el cual permitió obtener ADN de gran pureza e integridad. La diana ideal fue la correspondiente al gen codificante del ARN ribosomal 18S, por lo que se estandarizaron las condiciones de la reacción de esta PCR (concentración de reactivos, temperatura de hibridación y número de ciclos). Se determinó la sensibilidad analítica y especificidad de la técnica. Las condiciones óptimas para la PCR fueron: MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 100 μM, BSA 1 mg/mL, cebadores 0,2 μM, ADN Polimerasa 0,75 U, utilizando 35 ciclos y una temperatura de hibridación de 57 °C. La sensibilidad analítica de la PCR fue de 10 fg y la especificidad fue del 100%, por lo que es altamente sensible y específica para la detección de ADN de *Giardia intestinalis*

Palabras clave: *Giardia intestinalis*, Estandarización, Diagnóstico, PCR

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA
“PROFA. OMAIRA FIGUEROA”**

**STANDARIZATION OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE
FOR THE MOLECULAR DETECTION OF *Giardia intestinalis* IN FECES
SAMPLES**

Bachilleres: María Moreno y Mariangel Moronta

Tutor Científico: Dra. Elizabeth Ferrer

Tutora Metodológica: Dra. Daria Camacho

ABSTRACT

Molecular techniques are an excellent alternative for the diagnosis of giardiasis, caused by *Giardia intestinalis*, but it is necessary to evaluate and determine the best amplification target, optimal reagent conditions and the standardization of a PCR protocol for its detection. The objective of this work was based on the standardization of a PCR for the molecular detection of the parasite based on two amplification targets (Cathepsin L and the gene encoding 18S ribosomal RNA) and standardization of the PCR where better results were obtained. For DNA extraction, the Promega commercial kit, Wizard® Genomic DNA Purification Kit, was used from fecal samples, which allowed obtaining DNA of great purity and integrity. The ideal target was the gene encoding 18S ribosomal RNA, so the reaction conditions of this PCR were standardized (reagent concentration, hybridization temperature and number of cycles). The analytical sensitivity and specificity of the technique were determined. The optimal conditions for PCR were: 1.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 1 mg/mL BSA, 0.2 µM primers, 0.75 U DNA Polymerase, using 35 cycles and a hybridization temperature of 57 °C. The analytical sensitivity of the PCR was 10 fg and the specificity was 100%, making it highly sensitive and specific for the detection of *Giardia intestinalis* DNA.

Keywords: *Giardia intestinalis*, Standardization, Diagnosis, PCR

INTRODUCCIÓN

Entre las enfermedades parasitarias causantes de diarrea más importantes, por su elevada prevalencia, destaca la giardiasis producida por el protozoario *Giardia intestinalis*, cuya sinonimia es *Giardia lamblia* o *Giardia duodenalis*; siendo este el parásito intestinal más común en el mundo (Plutzery cols., 2010; Alnomasy y cols., 2021). Este parásito se adhiere y coloniza la parte superior del intestino delgado, causando diarrea acuosa aguda en humanos y animales. Es un importante protozoario zoonótico y la principal causa de giardiasis humana, por lo que representa una amenaza para la salud pública (Li y cols., 2020)

Giardia intestinalis es un protozoario flagelado del género *Giardia* y especie *intestinalis*. Hasta el momento se conocen ocho genotipos o variantes llamados “ensamblajes”, algunos de ellos son específicos del hospedador, mientras que otros se encuentran frecuentemente en humanos y se consideran potencialmente zoonóticos porque también se han encontrado en las heces de animales domésticos como gatos y perros (Sarria y cols., 2022). Los ensamblajes descritos son: A (Subtipos AI-AVI) (humanos y animales), B (Subtipos BIII, BIV) (humanos y animales), C (perros), D (perros), E (animales de granja), F (gatos), G (ratas) y H (mamíferos marinos).

La especie de *G. intestinalis* tiene dos fases del ciclo vital: el trofozoíto flagelado que se adhiere a las microvellosidades intestinales y un quiste infeccioso que persiste en el medio ambiente. El trofozoíto tiene forma piriforme, mide aproximadamente 15 μm de longitud por 7 μm de ancho. Posee una ventosa en la mitad anterior de su cuerpo por la cual se adhiere a la mucosa intestinal. En la parte central de su diámetro longitudinal posee un axostilo del cual emergen cuatro pares de flagelo, el axostilo es atravesado en el centro por unas estructuras llamadas cuerpos parabasales y los dos núcleos poseen nucléolos centrales (Botero y Restrepo, 2012). Los quistes tienen forma ovalada y miden de 8 a 19

µm; los quistes maduros tienen cuatro núcleos y los inmaduros dos (Ash y Orihel, 2010).

El ciclo de vida de *G. intestinalis* ocurre en hospedadores caninos, felinos y humanos. La fase quística se elimina al medio ambiente por medio de las heces a través del ano y la infección humana ocurre principalmente a través de la ruta fecal-oral por el consumo de agua y alimentos contaminados con el quiste (Mahdavia y cols., 2022). La desenquistación comienza en el estómago, donde las paredes del quiste se debilitan por las proteasas del hospedador y el pH ácido, y se completa en la parte superior del intestino delgado. Los trofozoítos se liberan en la luz y se dividen por fisión binaria para luego adherirse al epitelio del hospedador a través de un disco adhesivo ventral. El ciclo de vida se completa cuando los trofozoítos se desprenden y comienzan a moverse a lo largo del tracto gastrointestinal, donde se exponen a la bilis e inician la enquistación para formar nuevos quistes que se excretan hacia el medio ambiente (Fekete y cols., 2021).

El parásito se transmite por medio del contacto directo con las heces de donde se adquieren los quistes y estos son llevados a la boca del hospedador susceptible por medio de las manos, alimentos o aguas contaminadas (Groudan y cols., 2021). Los síntomas suelen aparecer de 1 a 3 semanas después de la exposición e incluyen diarrea, calambres abdominales, distensión abdominal, gases y náuseas. Aunque generalmente es auto-limitada, puede progresar a deshidratación, desnutrición, retraso en el desarrollo y síndrome de malabsorción, especialmente en personas inmuno deprimidas. El diagnóstico y el tratamiento tempranos son imprescindibles para prevenir y controlar la infección por *G. intestinalis* (Watkins y Eckmann, 2014).

G. intestinalis presenta una distribución mundial, mostrando una prevalencia del 2-7% en países desarrollados y puede llegar a más del 30% en países de bajos y medianos ingresos (Fantinatti y cols., 2021). La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1996 informó que la giardiasis afectaba a 200.000 millones de personas en Asia, África y América Latina, y que cada año se producían 500.000 nuevos casos. En 2002, el número de personas infectadas en todo el mundo

aumentó hasta 280 mil millones. Además, en 2004, la OMS declaró la giardiasis como una enfermedad desatendida. Desde entonces y hasta la actualidad se sigue manteniendo el estatus de enfermedad ignorada o desatendida. En América Latina, se considera que el país con menor prevalencia es Colombia, y el que posee mayor prevalencia es Brasil (Sarria y cols., 2022).

La giardiasis es la causa de diarrea en hasta 20% de los casos en países en vías de desarrollo, pero sólo de 3-7% en países desarrollados. En estos continúan presentes los casos de giardiasis transmitidos a través de la contaminación hídrica, debido a la resistencia de los quistes de *G. intestinalis* a las medidas convencionales de tratamiento de agua, aunque también los viajes a países de menor desarrollo son una causa fundamental de casos de giardiasis en estas regiones del mundo. El riesgo en los viajeros internacionales, se relaciona con factores como el saneamiento en el país de acogida y las actividades que exponen a los viajeros a aguas contaminadas, y aumenta con la duración de la estancia (AMSE, 2016).

En Venezuela, la giardiasis constituye un problema de salud pública, debido a la concurrencia de diversos factores de riesgo, como contaminación de las fuentes de agua de consumo humano, la deficiente educación sanitaria y bajo nivel socioeconómico, así como en otros países latinoamericanos. Las tasas de prevalencias son variables, pero pueden ser particularmente altas en comunidades rurales e indígenas. En el caso del estado Bolívar, estudios de parasitosis intestinales realizados en comunidades rurales han mostrado prevalencias considerables (25,2-44,1%) para *G. intestinalis* (Devera y cols., 2014, 2020; Incani y cols., 2017).

El diagnóstico de las parasitosis intestinales basado en las manifestaciones clínicas no se recomienda ya que la sintomatología, cuando se presenta, es variada e inespecífica. Los datos epidemiológicos, aunque ayudan, tampoco son definitivos. El diagnóstico de certeza, consiste en la visualización de las formas parasitarias (Devera y cols., 2020).

La detección *G. intestinalis* se basa principalmente en el examen microscópico de las heces, se usa una suspensión fecal en solución salina fisiológica (NaCl 0,85%) la cual va a permitir observar los trofozoítos móviles, o se puede observar teñida con yodo (solución de Lugol al 2-5%) que permite observar las estructuras internas. Otras técnicas usadas son mediante concentración, por flotación (sulfato de zinc) o sedimentación (formol-éter). Estas técnicas presentan una sensibilidad del 50-70% cuando se procesa una sola muestra. Para aumentar las posibilidades diagnósticas de este examen, se recomienda analizar tres muestras fecales a intervalos de 2-3 días durante un período de tiempo no superior a 10 días, alcanzando valores en torno al 90%. Se puede afirmar, incluso, que el examen microscópico de seis muestras puede no revelar su existencia, y, en ningún caso, la persistente negatividad de dichos exámenes puede excluir esta parasitosis. Debido a la baja sensibilidad de la coprología, se ha desarrollado la técnica de “Entero-Test”, que permite la adhesión y posterior observación de los trofozoítos de *G. intestinalis* a una cápsula que se introduce por vía oral (Hooshyar y cols., 2019).

Por otro lado, existen algunos métodos inmunológicos para el diagnóstico de giardiasis en muestras biológicas que permiten la detección de anticuerpos contra el parásito. Esa detección se realiza principalmente mediante las técnicas de inmunoensayo enzimático (ELISA, por sus siglas en inglés, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Hemaglutinación indirecta (HAI). Se han desarrollado técnicas de ELISA para la detección de antígenos del parásito, pero su uso no elimina la necesidad de analizar múltiples muestras de heces para una detección precisa (CDC, 2022).

En general, los métodos convencionales que utilizan la coprología y la inmunología tienen restricciones como la limitada sensibilidad, sobre todo en bajas cargas parasitarias y la necesidad de experiencia profesional en el diagnóstico de giardiasis. Además, de que no se lleva un adecuado control epidemiológico por las limitaciones que se presentan al momento de detectar la parasitosis, ya que pueden resultar falsos negativos, lo que lleva a sólo detectar y tratar a un grupo de

personas que resultaron positivas, teniendo riesgo de que otra parte de la población también esté infectada y siga diseminando el parásito (Dacal y cols., 2020).

El diagnóstico molecular es un área dinámica en desarrollo constante que ha revolucionado el diagnóstico clínico. Un conocimiento más profundo de las variaciones genéticas entre géneros y especies asociadas con una mayor posibilidad de investigaciones moleculares son razones para el desarrollo significativo de métodos basados en la técnica denominada Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) específicos para diagnosticar enfermedades parasitarias gastrointestinales. Es importante destacar que estos enfoques moleculares presentan una mayor sensibilidad y especificidad en poblaciones de baja carga parasitaria en comparación con los enfoques de microscopía (Argy y cols., 2022).

La PCR es un método para la identificación rápida y precisa, además de ser una técnica sensible y específica en el diagnóstico de laboratorio de infecciones parasitarias intestinales (Meningher y cols., 2019). Se han descrito varios protocolos de PCR basados en diferentes dianas tales como: secuencias del gen codificante del ARN ribosomal de la subunidad pequeña (*ssRNA* del inglés, *small subunit ribosomal ribonucleic acid*) (Verweij cols., 2004) y la secuencia de la catepsina L (Bairami y cols., 2016). Además, estudios moleculares basados principalmente en el ADN codificante del ARN ribosomal de la subunidad pequeña (*ssu-RNA*) (Verweij cols., 2004), β -giardina (*bg* del inglés, *Beta Giardin*) (Cacciò y cols., 2002), glutamato deshidrogenasa (*gdh* del inglés, *Glutamate Dehydrogenase*) (Monis y cols., 1999) y triosa fosfato isomerasa (*tpi* del inglés *Triose Phosphate Isomerase*) (Sulaiman y cols., 2003), han permitido identificar ocho genotipos de *Giardia intestinalis*.

G. intestinalis exhibe una alta actividad proteolítica y las cistein proteasas (catepsinas) están directamente implicadas en la alteración del complejo de unión epitelial intestinal, la apoptosis de las células epiteliales intestinales y la

degradación de los factores inmunitarios del hospedador, incluidas las quimiocinas y las inmunoglobulinas. Además, se ha implicado en la depleción de moco y la disbiosis de la microbiota inducida por el parásito. Dada su importancia, los genes codificantes de catepsinas están altamente representados en el parásito, de allí también su uso en diagnóstico y caracterización (Allain y cols., 2019).

Se han realizado una gran cantidad de estudios para diagnosticar *Giardia*, autores como Bairami y cols. en 2016, compararon la técnica de PCR, basada en la detección del gen de la Catepsina L, con la microscopía para la detección de la infección por *Giardia intestinalis* en muestras de heces. La sensibilidad de la PCR fue 100% para la detección del ADN de *G. intestinalis* de las muestras de heces de los pacientes que resultaron positivas para los quistes y trofozoítos de *G. intestinalis* utilizando la microscopía como patrón de oro. En comparación con la microscopía, la PCR mostró una especificidad del 97,9%.

Verweij y cols. en 2004 reportaron la detección simultánea de *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* y *Cryptosporidium parvum* en muestras fecales mediante PCR múltiple en tiempo real, con muestras de heces y ADN controles. El ensayo múltiple en tiempo real para la detección de *E. histolytica*, *G. intestinalis* y *C. parvum* logró una especificidad del 100 %. En todas las muestras analizadas en las que la microscopía reveló la presencia de *E. histolytica*, *G. intestinalis* o *C. parvum*, se detectó una amplificación específica. La detección de ADN específico del parásito tiene el potencial de reducir la cantidad de muestras de heces que requieren análisis para el diagnóstico de estas infecciones.

Incani y cols., en 2017, desarrollaron un estudio para el diagnóstico de parásitos intestinales en una comunidad rural de Venezuela para evaluar las ventajas y desventajas del uso de la microscopía o la PCR en tiempo real (RT-PCR). Determinaron la prevalencia y el rendimiento diagnóstico de la microscopía, y la RT-PCR para 14 parásitos intestinales en una comunidad rural venezolana con una larga historia de infecciones parasitarias intestinales persistentes a pesar de la implementación de tratamientos regulares. Se utilizó una RT-PCR múltiple para la detección de *Giardia intestinalis*, entre otros parásitos. La combinación

microscopía-PCR reveló prevalencias de 35,1% para *G. intestinalis*. En conclusión, se evidenció que el diagnóstico de parásitos intestinales basado en la RT-PCR tiene un buen rendimiento en condiciones de campo, proporcionando elevados porcentajes de prevalencia para la mayoría de los parásitos estudiados.

Basmacıyan y cols. (2021), con el objetivo de mejorar el diagnóstico de infecciones intestinales por protozoos, basaron su investigación en ensayos comerciales de PCR simple y multiplex para la detección de parásitos intestinales *Giardia intestinalis*, *Entamoeba* spp., *Cryptosporidium* pp., realizaron una evaluación comparativa de siete estuches comerciales de PCR comerciales con ensayos de PCR convencionales de rutina, los siete ensayos de PCR comerciales mostraron una especificidad >99 % asociada con sensibilidades variables según el parásito evaluado (desde el 64,5 al 100 %), los ensayos de PCR comerciales mostraron un rendimiento satisfactorio para la detección en muestras de heces de los tres protozoos intestinales más comunes responsables de las enfermedades parasitarias intestinales en los países desarrollados. Además, los ensayos de PCR multiplex ahorran tiempo en comparación con la microscopía.

Los autores Sarria y cols. En 2021 realizaron revisiones sistemáticas y metanálisis entre el 01 de enero de 2017 y el 03 de octubre de 2021; la búsqueda se centró en la identificación molecular de *Giardia spp* en América Latina. El material encontrado fue revisado para seleccionar sólo aquellos trabajos que completaran los criterios de inclusión y sólo 19 investigaciones en seis países (Brasil, Colombia, Cuba, Ecuador, México y Venezuela) cumplieron con los criterios. La mayoría fueron estudios transversales realizados en niños en edad escolar, los ensamblajes dominantes fueron el A y el B mientras que los sub-ensamblajes más frecuentes fueron el AII, el BIII y el BIV, los genes diana más utilizados fueron el *tpi* y el *gdh*, la prevalencia por métodos moleculares fue mayor con respecto a la microscopía, los países con mayores porcentajes de prevalencia para giardiasis fueron Brasil y Cuba. Es necesario que más países de América Latina generen datos de prevalencia, incidencia e intensidad de giardiasis.

Los trabajos descritos anteriormente demuestran que la técnica PCR, representa una buena opción en el diagnóstico de la enfermedad. Por tal motivo, en este trabajo de investigación se estandarizaron las condiciones de la PCR para la amplificación del gen 18S codificante del ARN ribosomal de *Giardia intestinalis*, siendo de suma importancia por su alta sensibilidad y especificidad a la hora de diagnosticar la parasitosis en poblaciones vulnerables, y así evitar la diseminación del parásito en la población, además de ayudar a llevar un control epidemiológico adecuado y actualizado.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar la técnica de PCR para el diagnóstico molecular de *Giardia intestinalis* en muestras de heces.

Objetivos Específicos

1. Obtener ADN en condiciones óptimas para la amplificación por PCR
2. Ensayar PCR para dos dianas de amplificación (Catepsina L y el gen codificante del ARN ribosomal 18S).
3. Establecer las condiciones de reacción de la PCR para la amplificación de la diana del gen codificante del ARN ribosomal 18S
4. Determinar sensibilidad y especificidad analítica de la técnica de PCR estandarizada.
5. Identificar el ADN de *G. intestinalis* en muestras de heces de individuos infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de investigación

La investigación fue de tipo descriptiva y experimental. Descriptiva, debido a que se caracterizaron los resultados obtenidos, tanto en las condiciones de reacción, como en los resultados de la prueba, así como los factores asociados a los positivos y negativos identificados por la técnica de PCR, y se establecieron las condiciones donde se obtuvo el mejor rendimiento.

Experimental, debido a que se manipularon y controlaron las variables relacionadas con las condiciones de reacción (temperatura y número de ciclos) y concentraciones de reactivos que fueron ensayados en las técnicas de extracción de ADN y PCR, determinando así las condiciones óptimas de reacción.

Muestras

Muestras biológicas

Para la estandarización y evaluación de la sensibilidad analítica de las PCR, se emplearon muestras de heces con *G. intestinalis* de pacientes infectados, estas fueron las fuentes de ADN.

Para la validación se emplearon 10 muestras de heces con coprología positiva (Controles positivos), y 9 de individuos infectados con otros protozoarios (Controles negativos heterólogos).

Las muestras empleadas fueron recolectadas previamente en la comunidad Tierra Blanca, estado Bolívar (zona endémica para giardiasis según diagnóstico coproparasitológico) para un proyecto en colaboración de determinación de parasitosis intestinales, con el laboratorio de Investigaciones en Bilharzia del

Departamento de Parasitología de la Facultad de Ciencias de la Salud Sede Carabobo (Dr. Nino Incani y Lcdo. Jhon Jesús). Cada paciente accedió a participar previa autorización mediante un consentimiento informado. De igual manera, se les comunicó que las muestras serían usadas, además de su diagnóstico y tratamiento, con fines de investigación. Conjuntamente, se utilizaron muestras de heces confirmadas con *Giardia intestinalis* por métodos coproparasitológicos proveniente de individuos de diferentes zonas [La Victoria, estado Aragua (LVM1), Turmero, estado Aragua (PCM1, PCM2, PCM3, VWM1, VBM1), Cagua, estado Aragua (CGM1), Maracay, estado Aragua (GCM1) y Barquisimeto, estado Lara (BQTM1)].

Tabla 1. Muestras empleadas para la estandarización de la técnica PCR

MUESTRA	CODIGO
Turmero, estado Aragua	PCM1, PCM2, PCM3, VWM1, VBM1
Cagua, estado Aragua	CGM1
Maracay, estado Aragua	GCM1
La Victoria, estado Aragua	LVM1
Barquisimeto, estado Lara	BQTM1

Método para la extracción de ADN

El método utilizado para la extracción de ADN fue mediante el estuche comercial de Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit con la finalidad de lograr un procedimiento de extracción simple y confiable, permitiendo la amplificación de ADN de las muestras. Luego de la extracción, el ADN fue disuelto en 100 µL de agua esterilizada. Las muestras de ADN extraído fueron mantenidas

a -20 °C hasta su uso. La evaluación del método de extracción se basó en el rendimiento, pureza e integridad del ADN.

Procedimiento Experimental

Medida de la concentración, pureza e integridad del ADN

La concentración y pureza del ADN extraído fueron determinadas por los métodos descritos por Sambrook y Russell (2001). La concentración de ADN fue medida en un espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech, midiendo la densidad óptica a 260 y 280 nm, usando la siguiente fórmula: $[ADN] = A_{260nm} \times D \text{ (Factor de dilución)} \times 50 \mu\text{g/mL}$. El grado de pureza se calculó mediante la relación A_{260nm}/A_{280nm} y su integridad fue evaluada mediante electroforesis horizontal de agarosa.

Electroforesis de ADN

La electroforesis de ADN se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Sambrook y Russell (2001). La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 3%, usando el tampón TAE (Tris-acetato-EDTA, Tris Ácido acético 40 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0) y un sistema de electroforesis horizontal MINICELL* Primo EC 320 de TDFI. El voltaje a usar fue de 60-100V, de acuerdo con el tamaño del gel. Los geles fueron teñidos con Syber Gold (1/10.000). Las bandas de ADN se visualizaron con luz UV usando el sistema Gel Doc 1000 de BioRad. El tamaño de las bandas de ADN se determinó, comparándolas con aquellas de los marcadores de ADN; marcador de tamaño 1 kb *ADN Marker*, Axigen Biosciences para las muestras de ADN y marcador de tamaño molecular 50 y 100 pb *plus ADN ladder*, Promega® para los productos de PCR.

Evaluación preliminar de las dianas de amplificación.

Se evaluaron las dianas de amplificación, Catepsina L y el gen codificante del ARN ribosomal 18S. Se utilizaron los cebadores descritos en la tabla 1.

Tabla 2. Características de los cebadores para las diferentes dianas de amplificación de ADN por PCR para *Giardia intestinalis*.

Diana	Cebadores	Tamaño del producto	Referencia
Catepsina L	GIF (5' - AATCTGTT-GACTTAAGGGAGTA-3; posición 185–206) (Directo)	463 pb	Bairami y cols. (2016)
	GIR (5' -ATTGAGTCATT-ATAGGGATTGT-3; posición 647–626) (Reverso)		
ARN ribosomal 18S	Giardia-80 F (5'-GACGGCTCAGGACAACGGTT-3') (Directo)	62 pb	Verweij y cols. (2004)
	Giardia-127 R (5'-TTGCCAGCGGTGTCCG-3') (Reverso)		

Pb= Pares de bases

Estandarización de las PCRs para la detección de la secuencia del gen 18S codificante del ARN ribosomal y de la Catepsina L de *Giardia intestinalis*

Las PCRs para la amplificación de la secuencia del gen 18S codificante del ARN ribosomal y de la Catepsina L de *G. Intestinalis* se realizaron utilizando el ADN extraído de muestras de heces, aisladas de pacientes de la comunidad Tierra Blanca estado Bolívar. Además, se utilizó ADN extraído de muestras con evaluación coproparasitológica positiva para *G. intestinalis* provenientes de laboratorios ubicados en diferentes zonas. Las reacciones de amplificación fueron realizadas de acuerdo a los protocolos descritos por Verweij y cols. (2004) (18 S ADNr) y Bairami y cols. (2016) (Catepsina L).

Se emplearon los cebadores directos y reversos descritos en la tabla 1, se variaron las concentraciones de los diferentes reactivos (Cloruro de Magnesio, BSA, dNTPs, cebadores y ADN polimerasa), y las condiciones de reacción tales como temperatura, y número de ciclos.

Para la estandarización de las técnicas se analizaron las siguientes condiciones:

Concentración de ADN molde

Desde 100 nanogramos (ng) hasta 1 fentogramo (fg). Se hizo la curva utilizando las cantidades de ADN de 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 μ g, 10 μ g, y 1 μ g, 100 fg, 10 fg y 1 fg.

Concentración de los diferentes reactivos

Cloruro de Magnesio: desde 1,5 mM hasta 3 mM (1,5 mM, 2 mM, 2,5 mM, 3 mM)

Albúmina sérica Bovina ó BSA (del inglés, *Bovine Serum Albumin*): desde 0,5 mg/mL hasta 2 mg/mL (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2 mg/mL)

Desoxinucleótidostrifosfato (dNTPs): desde 50 μ M hasta 200 μ M (50, 100, 150 y 200 μ M).

Cebadores: desde 0,2 μ M hasta 0,8 μ M (0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 μ M).

Taq ADN polimerasa (Promega): desde 0,25 U hasta 1 U (0,25, 0,5, 0,75 y 1 U).

Programa de amplificación (temperaturas de hibridación y número de ciclos)

Las PCRs se llevaron a cabo teniendo como base los programas descritos por Verweij y cols. (2004) (18 S ADN_r) y Bairami y cols. (2016) (Catepsina L), variando la temperatura de hibridación (53, 55 y 57 °C) y el número de ciclos (30, 35 y 40 ciclos). Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 3% y comparados con marcadores de tamaño molecular (50 pares de bases de Promega®)

Determinación de la sensibilidad y la especificidad analíticas de la PCR

La sensibilidad se determinó haciendo curvas de titulación con diferentes cantidades de ADN (100 ng hasta 1 fg), y se determinó la cantidad mínima de ADN que produce amplificación.

La especificidad se determinó utilizando ADN de diferentes parásitos relacionados (*Entamoeba histolytica*, *Blastocystis* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Trypanosoma cruzi*, *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp.) y ADN humano, en los cuales no debería ocurrir amplificación.

Amplificación de la secuencia del gen 18S codificante del ARN ribosomal de *Giardia intestinalis* en muestras de heces de pacientes

Con las condiciones óptimas establecidas se realizó la PCR en un termociclador PTC- 200 (BIORAD®, Watertown, USA), cada amplificación incluyó un control negativo (libre de ADN) y un control positivo (con ADN del parásito). Posteriormente, los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa al 3 %, para su visualización y se compararon el tamaño de las bandas amplificadas (tamaño esperado de 62 pb) con las del marcador de tamaño molecular.

RESULTADOS

Utilizando toda la metodología descrita, se extrajo el ADN de las muestras y se hicieron ensayos preliminares para posteriormente estandarizar el protocolo que proporcionó los mejores resultados para la determinación de ADN de *Giardia intestinalis* a través de la técnica de PCR.

Obtención de ADN en condiciones óptimas para la amplificación

Se obtuvo ADN puro de muestras de heces confirmadas con *Giardia intestinalis* por métodos coproparasitológicos proveniente de individuos de diferentes zonas (LVM1, PCM1, PCM2, PCM3, VWM1, VBM1, CGM1, GCM1 y BQTM1). La técnica de extracción de ADN se realizó por medio del estuche comercial de Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit, el cual resultó ser una técnica simple y confiable para la obtención de ADN. La integridad del ADN se evaluó por electroforesis mediante gel de agarosa al 3% (figura 1). La evaluación del método de extracción se basó en el rendimiento, pureza e integridad del ADN.

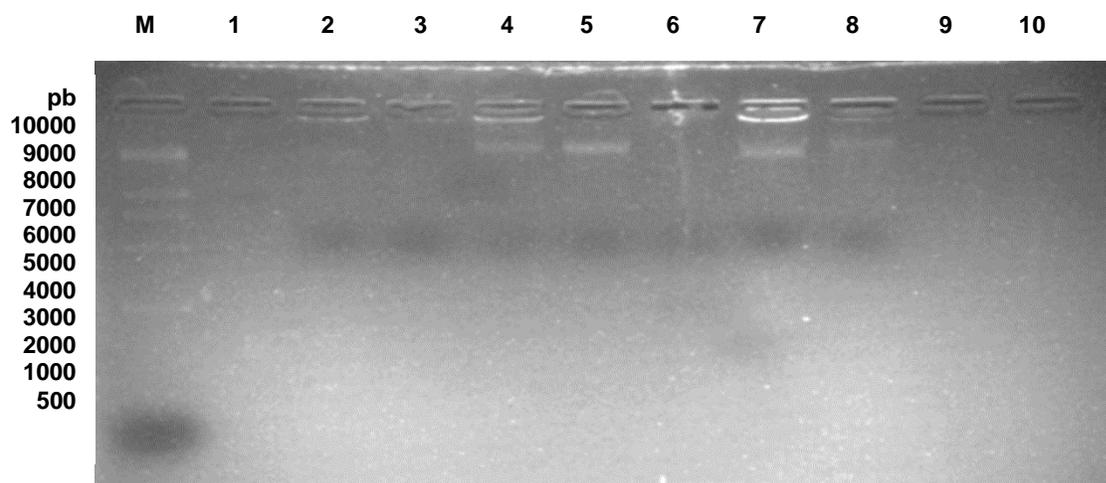


Figura 1. Integridad del ADN extraído de muestras confirmadas con *Giardia intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen. (M) Marcador 1 Kb Roche®. (2) LVM1; (3) BQTM1; (4) VWM1; (5) VBM1; (6) PCM1; (7) PCM2; (8) PCM3

Evaluación preliminar de dos dianas para la amplificación (Catepsina L y el gen codificante del ARN ribosomal 18S).

Con las muestras de ADN extraídas mediante el estuche comercial de Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit, se realizó un pool de muestras denominado “Pool 3”, provenientes de la comunidad Tierra Blanca del estado Bolívar a la cual se le realizaron diferentes diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000), además se utilizó la muestra BQTM1 a la cual también se le realizaron diferentes diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) y ambas se utilizaron para evaluar y comparar de manera preliminar dos dianas, Catepsina L y el gen codificante del ARN ribosomal 18S (figura 2 y 3).

Para la diana Catepsina L se esperaba un producto de 463 pb y no se obtuvo en ningún caso, solamente se observan los dímeros de cebadores (Figura 2).

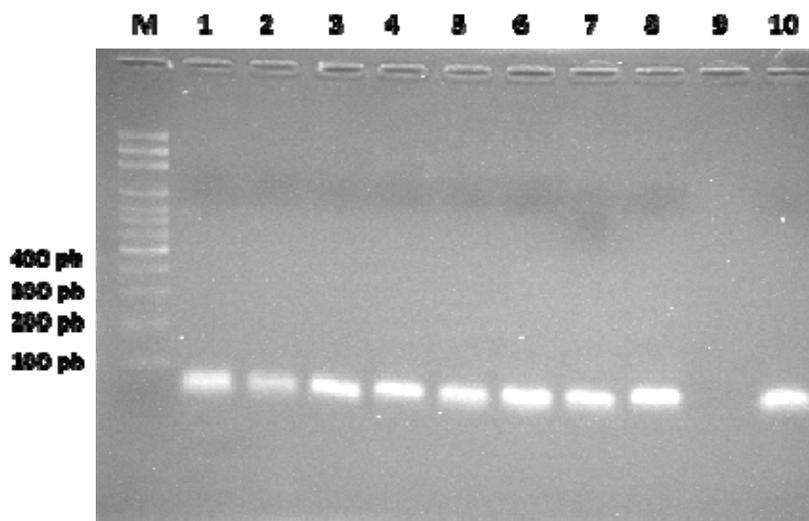


Figura 2. Evaluación preliminar utilizando como diana Catepsina L y ADN extraído de muestras confirmadas con *Giardia intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen. (M) Marcador 100 pb Promega®, (1) Pool 3, (2) dilución 1/10 del pool 3, (3) dilución 1/100 del pool 3, (4) dilución 1/1000 del pool 3, (5) muestra de BQTM1 (6) dilución 1/10 BQTM1, (7) dilución 1/100 BQTM1, (8) dilución 1/1000 BQTM1, y (10) control negativo

Para el ADN ribosomal 18S, si se observó amplificación de un producto de 62 pb en varias muestras (Figura 3).

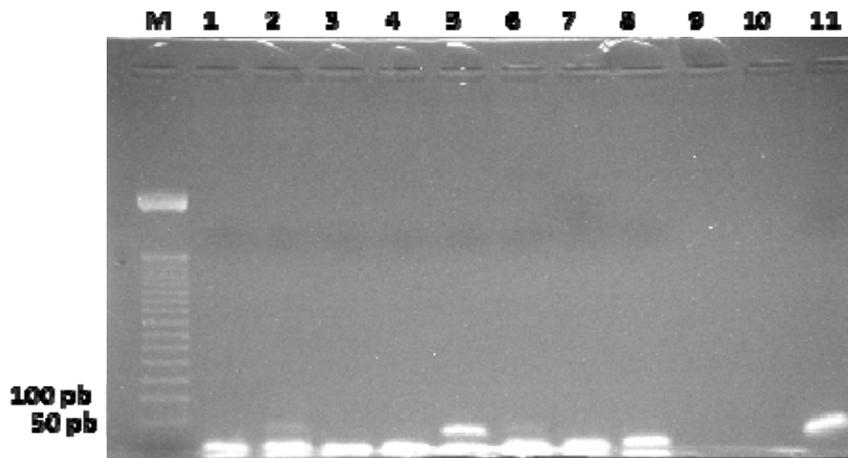


Figura 3. Evaluación preliminar utilizando como diana gen codificante del ARN ribosomal 18S y ADN extraído de muestras confirmadas con *Giardia intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen. (M) Marcador 50 pb Promega®, (1) Pool 3, (2) dilución 1/10 del pool 3, (3) dilución 1/100 del pool tres, (4) dilución 1/1000 del pool 3, (5) muestra BQTM1, (6) dilución 1/10 BQTM1, (7) dilución 1/100 BQTM1, (8) dilución 1/1000 BQTM1 y (11) control negativo

Se realizaron varios ensayos con diferentes condiciones y muestras utilizando la diana Catepsina L y en ningún caso hubo amplificación.

En vista de los resultados obtenidos, se utilizó como diana el gen codificante del ARN ribosomal 18S para realizar las demás determinaciones, ya que se observó una banda clara y única correspondiente a la muestra BQTM1

Posteriormente se procedió a realizar un pool nuevo de muestras denominado “pool 4”, el cual contiene muestras provenientes de la comunidad Tierra Blanca del estado Bolívar y la muestra BQTM1 , a la cual se le realizaron diferentes diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000), todo esto con el fin de obtener mejores resultados (figura 4)

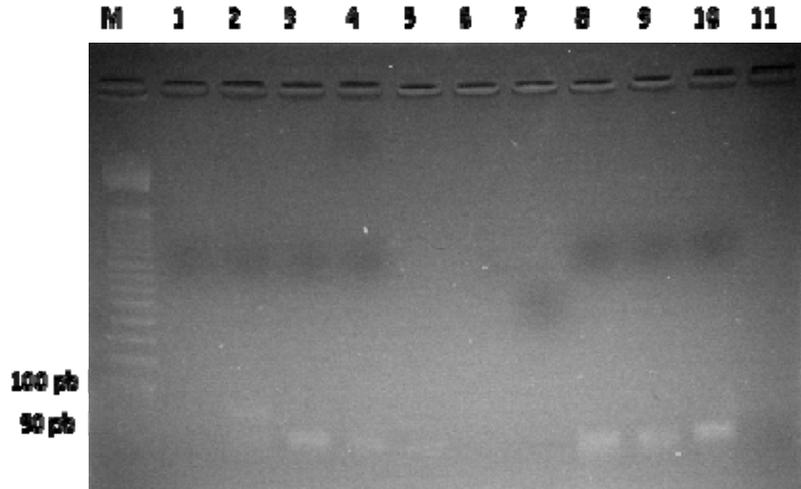


Figura 4. Evaluación preliminar diluciones de muestras de ADN para la amplificación de el gen codificante del ARN ribosomal 18S de muestras confirmadas con *Giardia intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen. (M) Marcador 50 pb Promega®, (1) Pool 4, (2) Dilución 1/10 del pool 4, (3) dilución 1/100 del pool 4, (4) dilución 1/1000 del pool 4, (8) control negativo, (9) control negativo y (10) control negativo

Se observaron resultados favorables en la dilución 1/100 del pool 4, más sin embargo, se continuó estudiando con otras muestras ya que la banda resultó débil.

Posteriormente se procedió a realizar otra PCR aumentando un poco la concentración de cebadores para ver si de esa manera se logran mejores resultados. Se utilizó nuevamente el pool 4 con diferentes diluciones, 1/10, 1/100 y 1/1000 (figura 5)

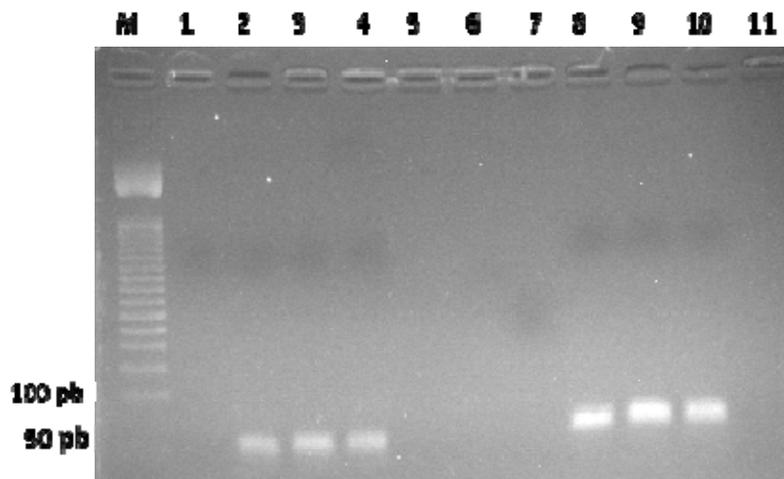


Figura 5. Evaluación preliminar de muestras confirmadas con *Giardia intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen. (M) Marcador 50 pb Promega®, (1) Pool 4, (2) Dilución 1/10 del pool 4, (3) dilución 1/100 del pool 4, (4) dilución 1/1000 del pool 4, (8) control negativo, (9) control negativo y (10) control negativo

Se obtuvieron bandas correspondientes a dímeros de cebadores, no hubo amplificación en las muestras y los negativos parecen contaminados, por lo cual se procedió a realizar una nueva PCR.

Posteriormente se procedió a realizar un nuevo pool denominado “Pool 5” que contiene diferentes muestras (muestras provenientes de la comunidad Tierra Blanca del estado Bolívar, BQTM1 y LVM1) a la que posteriormente se le realizaron dos diluciones (1/10 y 1/100). También se procedió a utilizar como muestra el pool 3 que contiene muestras provenientes de la comunidad Tierra blanca del estado Bolívar al cual se le realizo una dilución 1/10. De igual forma se le realizó una dilución 1/10 a la muestra BQTM1 y a la muestra LVM1 se le realizaron diferentes diluciones (1/10, 1/100, 1/1000), todo esto con el fin de evaluar la amplificación del ADN contenido en cada muestra para así utilizarla para valorar las condiciones de los reactivos para la realización de la PCR (figura 6)

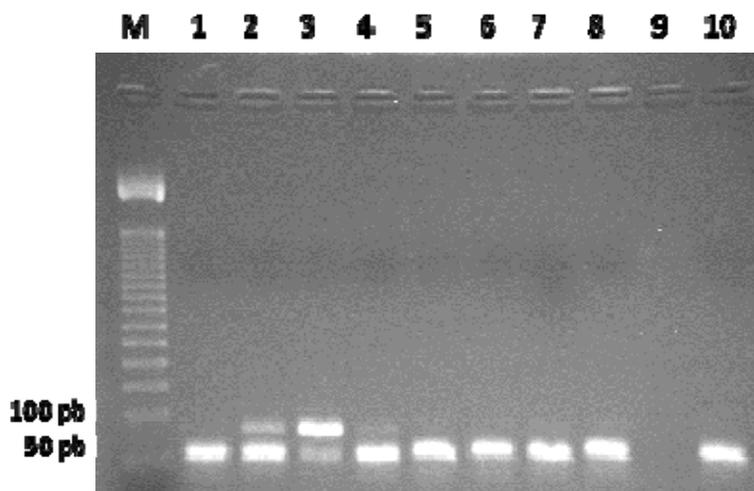


Figura 6. Evaluación preliminar de ADN extraído de muestras confirmadas con *Giardia intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen. (M) Marcador 50 pb Promega®, (1) Pool 3 de muestras procedentes del estado Bolívar, (2) dilución 1/10 BQTM1, (3) LVT1, (4) dilución 1/10 LVM1, (5) dilución 1/100 LVM1, (6) dilución 1/1000 LVT1, (7) dilución 1/10 del pool 5, (8) dilución 1/100 del pool 5 y (10) control negativo.

Según lo obtenido tomando en cuenta que se utilizó la diana correspondiente al gen codificante del ARN ribosomal 18S, se obtuvieron resultados favorables encontrándose un rango óptimo de cantidad de ADN, observándose la banda correspondiente a 62 pb para la muestra de ADN puro LVM1, la cual fue la utilizada para las determinaciones de condiciones de los reactivos de la PCR.

Determinación de las condiciones óptimas de reacción de la PCR para la amplificación de la secuencia del gen 18S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis* en muestras de heces.

Se evaluaron diferentes concentraciones de los reactivos de PCR ($MgCl_2$, dNTPs, BSA, cebadores y ADN polimerasa) y se observaron productos de amplificación de ADN con diferencias en su intensidad.

Para el $MgCl_2$ se variaron las concentraciones desde 1,5 hasta 3 mM, observándose la mejor amplificación a la concentración de 1,5 mM (Figura 7).

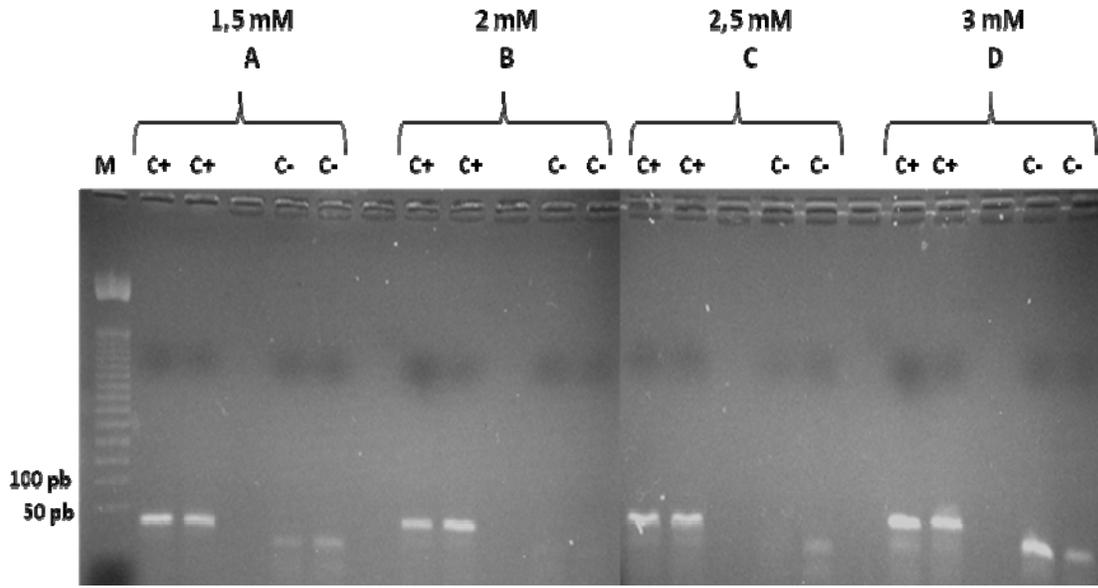


Figura 7. Concentraciones de $MgCl_2$ para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen de los productos de la PCR de *G. intestinalis*. M Marcador 50 pb Promega®. (A) 1,5 mM, (B) 2 mM, (C) 2,5 mM y (D) 3 mM. (C+) Control positivo, (C-) Control negativo.

Para los Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) se variaron las concentraciones desde 50 μM hasta 200 μM observándose bandas definidas para una concentración de 100 μM (Figura 8).

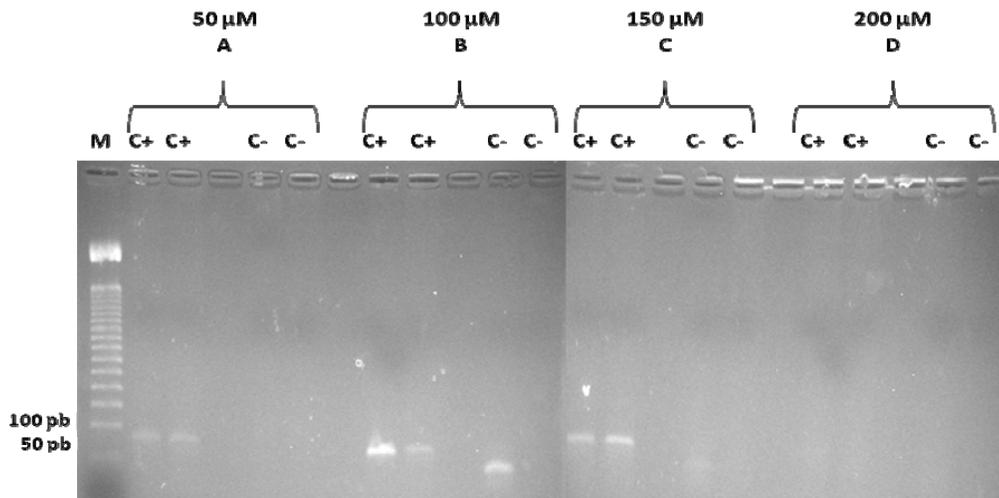


Figura 8. Concentraciones de dNTPs para la amplificación de la secuencia 18 S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen de los productos de la PCR de *G. intestinalis*. M Marcador 50 pb Promega®. (A) 50 μ M, (B) 100 μ M, (C) 150 μ M y (D) 200 μ M. (C+) Control positivo, (C-) Control negativo.

En el caso de las condiciones de la BSA, se varió su concentración desde 0.5 g/mL hasta 2 mg/mL obteniéndose una mejor amplificación en la concentración de 1 mg/mL, ya que para las concentraciones 0,5 mg/mL y 1,5 mg/mL se observó contaminación en los controles negativos y en la concentración de 2 mg/mL no hubo amplificación de bandas (figura 9).

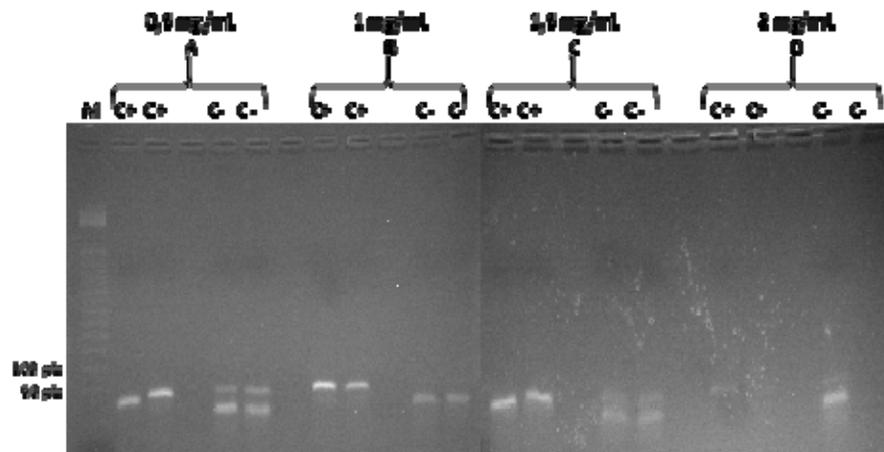


Figura 9. Concentraciones de BSA para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybrgreen de los productos de la PCR de *G. intestinalis*. M Marcador 50 pb Promega®. (A) 0,5 mg/ml, (B) 1 mg/mL, (C) 1,5 mg/mL y (D) 2 mg/mL. (C+) Control positivo, (C-) Control negativo.

En el caso de los cebadores, se variaron las concentraciones desde 0,2 μ M hasta 0,8 μ M observándose la mejor amplificación a la concentración de 0,2 μ M, ya que en el resto de las concentraciones se observó contaminación en los controles negativos (Figura 10).

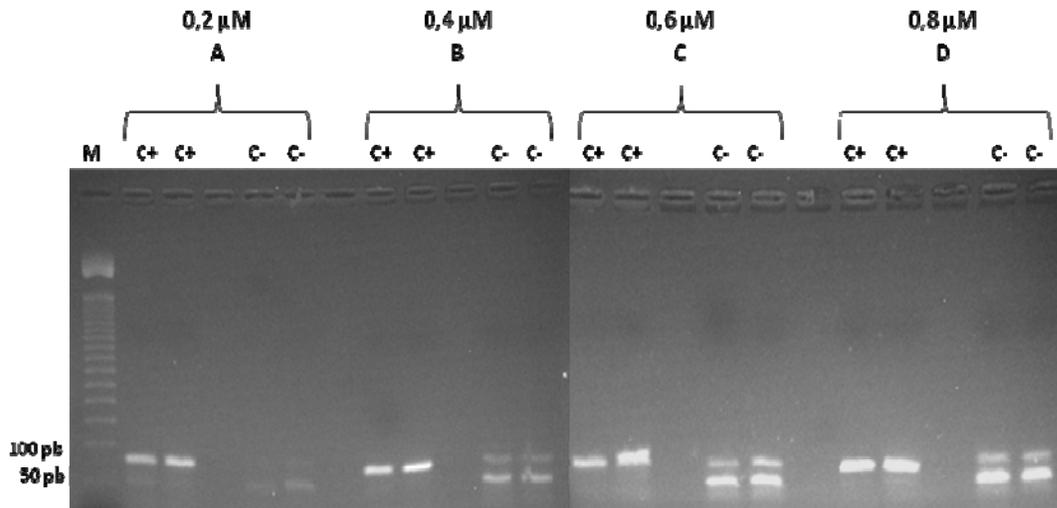


Figura 10. Concentraciones de Cebadores para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybgreen de los productos de la PCR de *G. intestinalis*. M (Marcador 50 pb Promega®). (A) 0,2 μM, (B) 0,4 μM, (C) 0,6 μM y (D) 0,8 μM. (C+) Control positivo, (C-) Control negativo.

Posteriormente, se variaron las concentraciones de la *Taq* polimerasa desde 0,25 U hasta 1 U, en el cual se pudo observar mejor amplificación para la concentración de 0,75 U ya que en la concentración de 0,25 U no hubo amplificación y en las concentraciones de 0,5 U y 1 U se observó una banda en el tamaño esperado, indicando contaminación del control negativo (Figura 11).

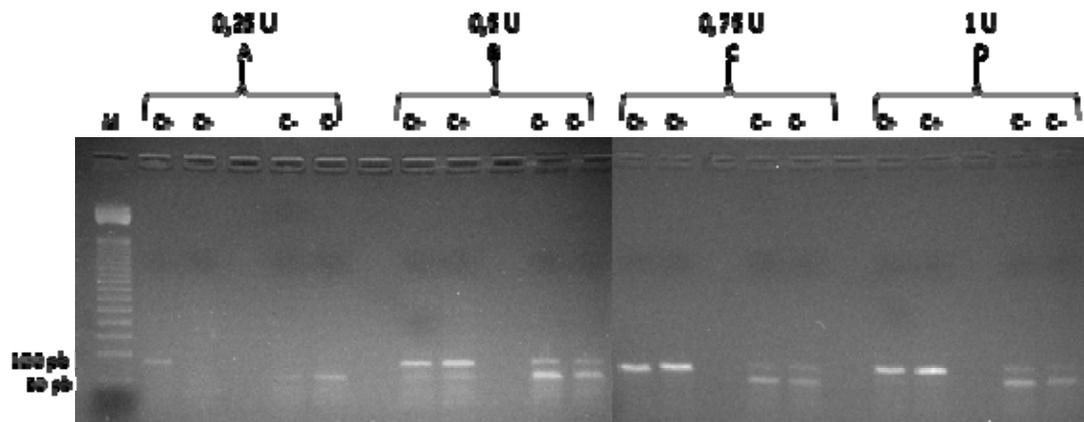


Figura 11. Concentraciones de la *Taq* Polimerasa para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Sybgreen de los productos de la PCR de *G. intestinalis*. M (Marcador 50 pb Promega®). (A) 0,25 U, (B) 0,5 U, (C) 0,75 U y (D) 1 U. (C+) Control positivo, (C-) Control negativo.

Con respecto al programa de amplificación, donde se evaluaron la temperatura de hibridación y el número de ciclos, se determinó que con la temperatura de hibridación de 57°C se evidencian bandas bien definidas y sin contaminación presente (Figura 12).

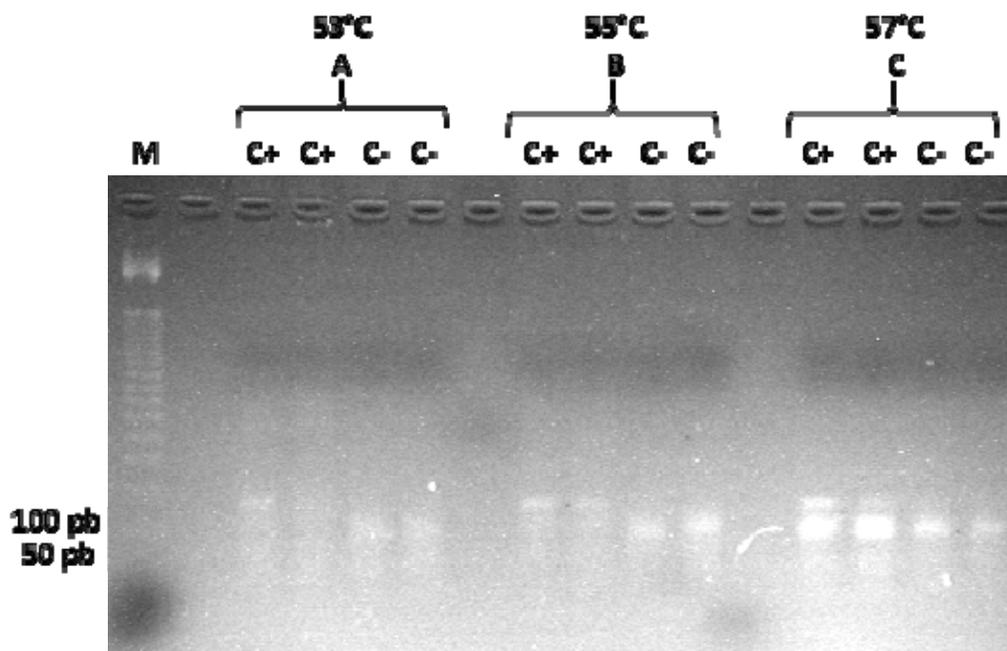


Figura 12. Estandarización de temperatura de hibridación. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Gel red de los productos de la PCR para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis*. (M) Marcador 50 pb Promega®, (A) 53°C, (B) 55°C, (C) 57°C. (C+) Control positivo, (C-) Control negativo.

Por otro lado, se realizó variación en el número de ciclos, comprobando que, al variar a 35 ciclos, se observan bandas bien definidas y sin contaminación, mientras que a mayor número de ciclos se observa contaminación. Por ello las condiciones óptimas seleccionadas fueron 57°C de temperatura y 35 ciclos (Figura 13).

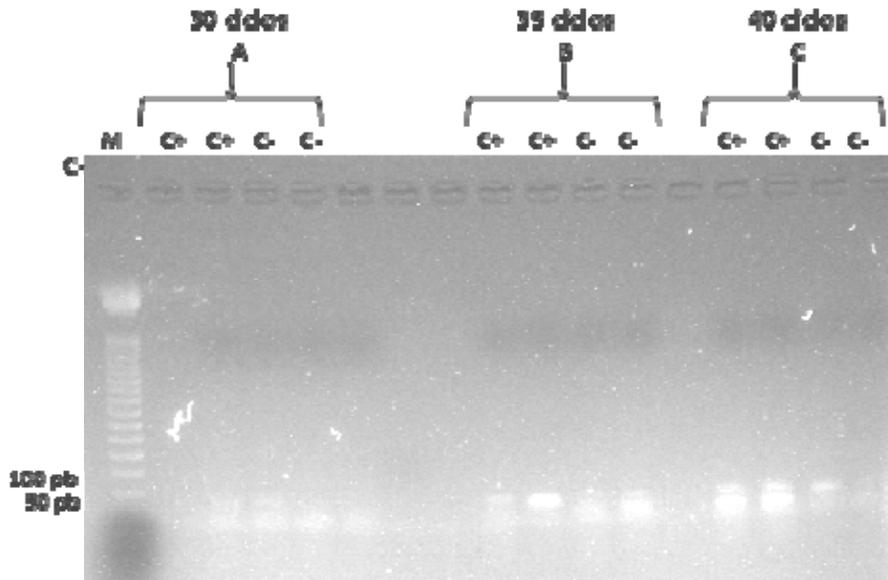


Figura 13. Estandarización de número de ciclos. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Gel red de los productos de la PCR para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis*. (M) Marcador 50 pb Promega®, (A) 30 ciclos, (B) 35 ciclos, (C) 40 ciclos. (C+) Control positivo, (C-) Control negativo.

Se compararon todas las condiciones ensayadas para la técnica de PCR. Las condiciones óptimas de reacción fueron aquellas donde se observaron bandas del tamaño esperado, únicas, nítidas y con ausencia de productos secundarios a través de imágenes fotográficas del sistema de fotodocumentación Gel Doc 1000® de Biorad de los geles de agarosa (Tabla 2).

Tabla 3. Condiciones elegidas para la estandarización de la PCR para la amplificación de la secuencia 18S codificante del ARN ribosomal de *G. intestinalis*

	Condiciones ensayadas	Condición óptima
Concentración de MgCl₂	1, 1,5 , 2 y 2,5 mM/mL	1,5 mM/MI
Concentración de Dntps	50, 100, 150, 200 µM/mL	100 µM/MI
Concentración de BSA	0,5, 1, 1,5 y 2 mg/mL	1 mg/mL
Concentración de Cebadores	0,2 , 0,4, 0,6, 0,8 µM	0,2 µM
Concentración de Polimerasa	0,25, 0,5, 0,75, 1U	0,75 U
Condiciones de temperatura	53, 55, 57 °C	57 °C
Número de ciclos	30, 35 y 40	35 ciclos

Una vez estandarizada la técnica de PCR, se determinó la sensibilidad y especificidad analítica. Para la determinación de la sensibilidad analítica de la PCR estandarizada, se hicieron diluciones seriadas de cantidad de ADN, variando las concentraciones desde 100 ng hasta 1 fg (100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg), con la finalidad de establecer la cantidad mínima de ADN que produce amplificación. En el gel de agarosa al 3% se pudo observar que el ADN fue capaz de producir amplificación en un rango que va desde concentraciones de 100 ng hasta 10 fg, siendo la sensibilidad analítica de la técnica 10 fg (Figura 14).

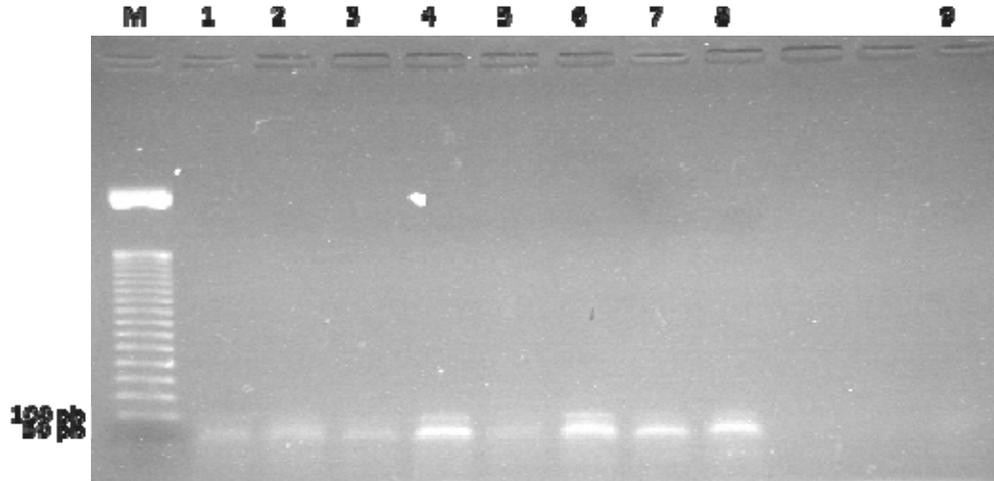


Figura 14. Determinación de la sensibilidad de la técnica de PCR para la amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 18S de *G. intestinalis*. Electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con Gel red (1 μ L/muestra) de los productos de la PCR de *G. intestinalis*. M (Marcador 50 pb Promega®) Concentración de ADN (1-9) 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1fg. (11) Control negativo.

Para la determinación de la especificidad se utilizó ADN molde de diferentes parásitos (*Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis*, *Cryptosporidium* sp, *Cyclospora cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi*) y ADN Humano, bajo las mismas condiciones de reacción, donde se demostró que solo hubo amplificación de las dos muestras de *G. intestinalis*, indicando una especificidad del 100% (Figura 15).

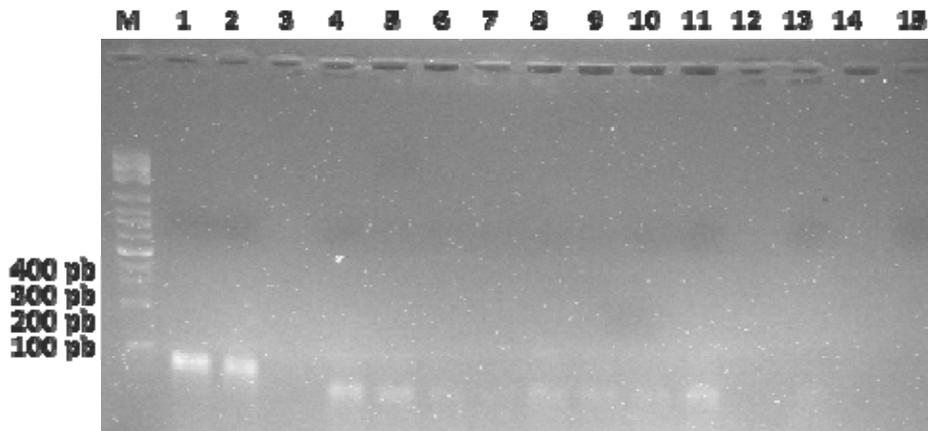


Figura 15. Determinación de la especificidad de la técnica de PCR para la amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 18S de *G. intestinalis*. **(M)** Marcador de tamaño molecular 50 pb ADN Promega®. 1 y 2 *G. intestinalis*. (Control positivo) 4: *Entamoeba histolytica* 5: *Blastocystis* sp., 6: *Dientamoeba fragilis*, 7: *Cryptosporidium* sp, 8: *Cyclospora cayetanensis*, 9: *Toxoplasma gondii*, 10: *Trypanosoma cruzi*, 11: *Leishmania chagasi*, 12: ADN Humano. 14: control negativo.

Identificación del ADN de *G. intestinalis* en muestras de heces de individuos infectados.

Posteriormente se realizó la técnica de PCR estandarizada (18S-ADNr) con muestras de heces de pacientes con *Giardia intestinalis* confirmadas por medio de técnicas coproparasitológicas, lo cual nos permitió confirmar y verificar las condiciones ensayadas anteriormente. Se pudo evidenciar amplificación (figura 16).

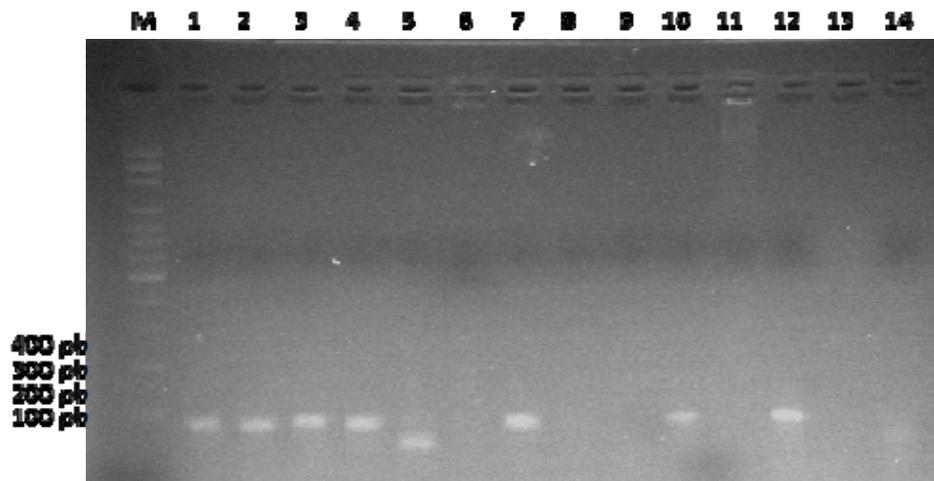


Figura 16. PCR para la amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 18S de *G. intestinalis*. **(M)** Marcador de tamaño molecular 50 pb ADN Promega®. 1: LVM1, 2: LVM1, 3: LVM1, 4: BQM1, 5: BQM1, 6: GCM1, 7: CGM1, 8: VWM1, 9: VBM1, 10: PCM1, 11:PCM1, 12: PCM1, 14: control negativo.

DISCUSIÓN

La giardiasis humana, causada por el parásito protozoario *Giardia intestinalis*, es una de las infecciones parasitarias entéricas más prevalentes a nivel mundial, con tasas de prevalencia que oscilan entre el 2% y el 5% en países desarrollados y el 20% en vías de desarrollo, alcanzando hasta un 30% (Yoder y cols., 2012; Solymani., 2022). La ingestión de quistes en agua o alimentos contaminados vía fecal-oral es el principal modo de transmisión, la Organización Mundial de la Salud (OMS) informó en sus últimos reportes que no se cuenta con fuentes de agua potable suficientes ni un correcto saneamiento para su consumo, así como tampoco una adecuada disposición de excretas, se reportan más de 200 millones de casos anualmente y, desde 2004, *G. intestinalis* ha sido incluida en la iniciativa de enfermedades desatendidas (Soares y Tasca.,2016; Alharbi., 2020; OMS., 2019).

El parásito se clasifica genéticamente en ocho divisiones separadas llamadas "conjuntos" (de A a H), que difieren en su especificidad para los hospedadores (Feng y Xiao., 2011). La infección humana es causada principalmente por los conjuntos A y B (Cacciò y cols., 2005). Además, las investigaciones moleculares han informado subconjuntos en los conjuntos A y B. El conjunto A se divide en tres subconjuntos (AI, AII, AIII) y el B en dos (BIII y BIV) que son genéticamente muy similares y están estrechamente relacionados entre sí otros dentro del mismo conjunto (Sprong y cols., 2009 ; Feng y cols., 2011; Chourabi y cols., 2021).

Los pacientes infectados por *G. intestinalis* pueden presentar bajas cargas parasitarias, lo que exhibe una baja sensibilidad por lo cual existe la necesidad de emplear muestras de heces seriadas en los métodos parasitológicos. En general, los métodos convencionales que utilizan la coprología y la inmunología tienen restricciones como la limitada sensibilidad, especificidad y la experiencia

profesional que la mayoría de las veces no permiten un diagnóstico adecuado de la enfermedad giardiasis (Dacal y cols., 2020).

Algunos investigadores han empleado los métodos de biología molecular para el diagnóstico de la enfermedad, por ser métodos que ofrecen alta sensibilidad y especificidad (Bairami y cols., 2015; Alharbi y cols., 2020). Para toda técnica de PCR se requiere una previa estandarización, adaptación y evaluación de las condiciones de reacción para su uso y deben ser validadas en cada laboratorio (Ferrer Elizabeth., 2015). En Venezuela, sólo existe un trabajo publicado sobre el uso de la técnica de PCR (18S-ADNr) para el diagnóstico de giardiasis (Incani y cols., 2017), pero, aunque las muestras eran de origen venezolano, el análisis por PCR se realizó en Holanda, por lo que es importante conocer cuál diana de amplificación, y con cuales condiciones, podría obtenerse un resultado óptimo para la detección molecular de los parásitos circulantes en nuestro país.

El aislamiento de ADN de alta calidad es esencial para realizar un buen diagnóstico mediante la técnica de PCR, (Dacal y cols., 2020), se deben establecer las condiciones óptimas para las diferentes técnicas de extracción de ADN por método convencional, a fin de lograr un procedimiento simple y confiable que permitiera la lisis del material parasitario, la extracción y purificación del ADN y la eliminación de sustancias inhibidoras de la reacción.

En la última década existen publicados muchos métodos para la extracción de ADN de muestras. En el pasado, el aislamiento de ADN, especialmente en muestras de heces, era problemático y laborioso debido a su complejidad ya que contienen muchos contaminantes, además, la amplificación y detección de ADN es sensible a la contaminación, costosa, requiere mucho tiempo. Recientemente, se han desarrollado métodos simples y eficaces para el aislamiento de ADN parásito de las heces y están disponibles en estuches comerciales (Dacal y cols., 2020; Verweij y cols., 2003; Sante y cols., 2022), como el utilizado en el presente trabajo, en el cual se realizaron extracciones de ADN a partir de muestras de

heces confirmadas con el protozoario *G. intestinalis* mediante el estuche comercial de Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit.

Por otro lado, con las muestras de ADN obtenidas a partir del estuche comercial se evaluaron dos dianas para la amplificación. Se realizaron múltiples ensayos preliminares de PCR para evaluar las condiciones de reacción utilizando dos pares de cebadores para el diagnóstico molecular de *G. intestinalis*.

En primer lugar, se realizó la amplificación de la secuencia de Catepsina L de *G. intestinalis*, variando las concentraciones de los diferentes reactivos de acuerdo al protocolo descrito por Bairami y cols., (2015). Sin embargo, con el uso de estos cebadores no se observó amplificación en ninguna de las condiciones ensayadas, por lo cual no se pudo finalizar la estandarización de la PCR para la amplificación de esta diana, por la falta de resultados positivos. Esto podría deberse a variabilidad genética de *G. intestinalis* en la secuencia de los cebadores que puede que no haya una complementariedad total y eso podría generar uniones débiles al ADN molde y poco estables, con lo cual puede que a veces no haya producto detectable o se observen bandas poco definidas. La variabilidad genética ha sido ampliamente reportada, así como también la frecuente aparición de infecciones con genotipos y subtipos mixtos, y la heterocigocidad aparente en algunos loci genéticos para algunos genotipos de *G. intestinalis* (Chourabi y cols. 2021; Feng y cols. 2011; Salamandame y cols., 2023).

Para realizar la estandarización de la técnica de PCR se seleccionó a partir de los resultados de las evaluaciones preliminares el gen codificante del ARN ribosomal 18S de *G. intestinalis* ya que fue la diana en la que siempre se obtuvo amplificación, en comparación con la otra diana estudiada. Para ello, se variaron las concentraciones de los diferentes reactivos, temperatura de hibridación y los números de ciclos con el fin de encontrar las concentraciones, temperatura y números de ciclos ideales.

Se realizó la estandarización de esta PCR basados en el protocolo descrito por Verweij y cols., (2004) en el presente trabajo se alcanzaron mejores resultados al utilizar concentraciones menores de MgCl₂, y un poco mayor la concentración

de cebadores. Igualmente ocurrió variación en el número de ciclos utilizados y en la temperatura de hibridación siendo menores.

Concentraciones menores de reactivos se utilizaron en comparación con el trabajo de Potes-Morales y cols. (2022), ya que ellos utilizaron mayor concentración de dNTPs y enzima Polimerasa.

Con respecto a la sensibilidad analítica de la técnica para la amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 18S de *G. intestinalis*, se obtuvo un rango de amplificación que va desde 100 ng (nanogramos) hasta 10 fg (fentogramo) lo cual corresponde a (10^{-15} gramos), indicando que la mínima cantidad de ADN que se amplifica mediante la técnica de PCR es de 10fg, siendo el equivalente a aproximadamente una milésima de un quiste (ya que un quiste contiene aproximadamente 10 picogramos de ADN) en 300 μ L de heces. La técnica de PCR estandarizada es capaz de detectar pequeñas cantidades de material genético de *G. intestinalis*, permitiendo su identificación, por lo que el ensayo de PCR podría ser una herramienta valiosa y de gran utilidad para el diagnóstico molecular de la giardiasis.

Por otra parte, se determinó que la técnica de PCR para la amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 18S, no amplifica ADN de parásitos relacionados como lo son; *Entamoeba histolytica*, *Blastocystis* sp., *Dientamoeba fragilis*, *Trypanosoma cruzi*, *Cryptosporidium* sp., *C. cayetanensis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp, así como ADN de humano, demostrando así que la técnica presenta un 100% de especificidad.

Varios estudios han demostrado la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares comparadas con las técnicas parasitológicas (Incani y cols. 2017; Sante y cols., 2022). Además, la existencia de PCR múltiples permite la detección rápida, sensible y fiable de los principales protozoarios intestinales, así como una reducción en la carga de trabajo y una disminución significativa en el tiempo hasta la obtención de un resultado (Incani y cols. 2017; Sante y cols., 2022; Sánchez y cols, 2022).

Es muy importante realizar estudios de secuenciación de ADN de *G. intestinalis* para confirmar que los resultados negativos con catepsina L se deban a variabilidad genética, ya que varios investigadores han obtenido buenos resultados con esta diana (Bairami y cols, 2015; Potes-Morales y Crespo-Ortiz, 2022).

Otro aspecto importante es conocer los haplotipos/genotipos/ensamblajes de *G. intestinalis* debido a su variabilidad genética y determinar que está circulando en nuestro país.

Este es el primer estudio molecular al respecto en Venezuela y los resultados obtenidos reflejan que la técnica de PCR para la amplificación del gen codificante del ARN ribosomal 18S de *G. intestinalis*, mostró una alta sensibilidad y especificidad, lo que podría permitir el diagnóstico precoz de la enfermedad y el seguimiento del tratamiento.

CONCLUSIONES

- La extracción de ADN realizada por medio del estuche comercial de Promega, Wizard® Genomic DNA Purification Kit, resultó ser una técnica sencilla y confiable para la obtención de ADN puro, manteniendo así la integridad del mismo
- La PCR basada en la amplificación del ADN de la secuencia de Catepsina L no mostró amplificación, por lo que esa diana no es adecuada para su uso en diagnóstico en nuestro país y requiere ser estudiada.
- La estandarización de la PCR basada en el gen 18 S ADNr mostró que las concentraciones óptimas fueron menores a las reportadas por otros autores.
- La sensibilidad de la técnica PCR-18S ADNr fue de 10 fg, equivalente aproximadamente a la milésima parte de un quiste del parásito.
- La técnica de PCR para la amplificación de la secuencia 18S ADNr de *G. intestinalis* mostró una alta especificidad, lo que la hace adecuada para el diagnóstico en nuestro país.

RECOMENDACIONES

- Llevar a cabo estudios de prevalencia utilizando la PCR estandarizada, como apoyo al diagnóstico para obtener datos epidemiológicos de la infección por giardiasis en Venezuela.
- Realizar estudios con la técnica estandarizada en muestras de heces de pacientes, con el fin de evaluar la especificidad y sensibilidad diagnóstica.
- Realizar estudios de secuenciación de ADN de *Giardia intestinalis* a fin de poder diseñar cebadores adecuados a los parásitos circulantes en el país.
- Ejecutar estudios de los diferentes genotipos que podrían estar circulando en humanos y animales, a fin de conocer más de la epidemiología de la giardiasis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allain, T., Fekete, E., & Buret, A. G. (2019). *Giardia* Cysteine Proteases: The Teeth behind the Smile. *Trends in parasitology*, 35(8), 636–648. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.05.002>
- Alharbi, A., Toulah, F. H., Wakid, M. H., Azhar, E., Farraj, S., & Mirza, A. A. (2020). Detection of *Giardia lamblia* by Microscopic Examination, Rapid Chromatographic Immunoassay Test, and Molecular Technique. *Cureus*, 12(9), e10287. <https://doi.org/10.7759/cureus.10287>
- Alnomasy, S., Al-Awsi, G., Raziani, Y., Albalawi, A. E., Alanazi, A. D., Niazi, M., & Mahmoudvand, H. (2021). Systematic review on medicinal plants used for the treatment of *Giardia* infection. *Saudi journal of biological sciences*, 28(9), 5391–5402. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.069>
- Argy, N., Nourrisson, C., Aboubacar, A., Poirier, P., Valot, S., Laude, A., Desoubeaux, G., Pomares, C., Machouart, M., Le Govic, Y., Dalle, F., Botterel, F., Bourgeois, N., Cateau, E., Leterrier, M., Le Pape, P., Morio, F., & Houze, S. (2022). Selecting a multiplex PCR panel for accurate molecular diagnosis of intestinal protists: a comparative study of Allplex® (Seegene®), G-DiaParaTrio (Diagenode®), and RIDA®GENE (R-Biopharm®) assays and microscopic examination. *Parasite* 29, 5. <https://doi.org/10.1051/parasite/2022003>
- Ash, L., Orihel, T. (2010). *Atlas de parasitología humana*. (Quinta edición). Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana S.A
- Asociación de Médicos de Sanidad Exterior AMSE. (2016). *Giardiasis Epidemiología y situación mundial* [Documento en línea]. Disponible: <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/187-giardiasis-epidemiologia-y-situacion-mundial> [Consulta: Julio 26, 2022]

- Bairami, A., Rezaei, S., & Rezaeian, M. (2016). Evaluation of a New Primer In Comparison With Microscopy for the Detection of *Giardia lamblia* Infection in Stool Samples. *Iranian Journal of parasitology*, 11(1), 19–23.
- Basmacıyan, L., François, A., Vincent, A., Valot, S., Bonnin, A., Costa, D., Razakandrainibe, R., Morio, F., Favennec, L., & Dalle, F. (2021). Commercial Simplex and Multiplex PCR Assays for the Detection of Intestinal Parasites *Giardia intestinalis*, *Entamoeba* spp., and *Cryptosporidium* spp.: Comparative Evaluation of Seven Commercial PCR Kits with Routine In-House Simplex PCR Assays. *Microorganisms*, 9(11), 2325. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112325>
- Botero, D., Restrepo, M. (2012). *Parasitosis humanas* (Quinta edición). Medellín: Corporación para investigaciones biológicas
- Cacciò, S. M., De Giacomo, M., & Pozio, E. (2002). 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. *International journal for parasitology*, 32(8), 1023–1030. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00068-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00068-1)
- Cacciò, S. M., Thompson, R. C., McLauchlin, J., & Smith, H. V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in parasitology*, 21(9), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.013>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Giardiasis* [Documento en línea]. Disponible: <https://www.cdc.gov/dpdx/giardiasis/index.html> [Consulta: Abril 17, 2022]
- Chourabi, M., Boughattas, S., Abdallah, A. M., Ismail, A., Behnke, J. M., Al-Mekhlafi, H. M., & Abu-Madi, M. (2021). Genetic Diversity and Prevalence of *Giardia duodenalis* in Qatar. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 652946. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.652946>

- Dacal, E., Köster, PC., Carmena, D. (2020). Diagnóstico molecular de parasitosis intestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38 (1), 24-31.
- Devera, R., Amaya, I., Blanco, Y. (2020) *Prevalencia de parásitos intestinales en niños preescolares del municipio Angostura del Orinoco, estado Bolívar, Venezuela. 2016-2018* KASPERA. (48)2: e48231681 <https://doi.org/10.5281/zenodo.4276398>
- Devera, R., Blanco, Y., Amaya, I., Álvarez, E., Rojas, J., Tutaya, R., Velásquez, V. (2014). *Prevalencia de parásitos intestinales en habitantes de una comunidad rural del estado Bolívar, Venezuela*. KASPERA, (42), 22-31.
- Fantinatti, M., Gonçalves-Pinto, M., Lopes-Oliveira, L., & Da-Cruz, A. M. (2021). Epidemiology of *Giardia duodenalis* assemblages in Brazil: there is still a long way to go. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e200431. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200431>
- Fekete, E., Allain, T., Siddiq, A., Sosnowski, O., & Buret, A. G. (2021). *Giardia* spp. y la Microbiota intestinal: Relaciones peligrosas. *Frontiers in microbiology*, 11, 618106. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618106>
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clinical microbiology reviews*, 24(1), 110–140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00033-10>
- Ferrer, E. (2015). Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista Saber UDO* 27(3): 359-371.
- Groudan, K., Gupta, K., Chalhoub, J., & Singhania, R. (2021). *Giardia lamblia* Diagnosed Incidentally by Duodenal Biopsy. *Journal of investigative medicine high impact case reports*, 9, 23247096211001649. <https://doi.org/10.1177/23247096211001649>
- Hooshyar, H., Rostamkhani, P., Arbabi, M., & Delavari, M. (2019). *Giardia lamblia* infection: review of current diagnostic strategies. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 12(1), 3–12.

- Incani, R., Ferrer, E., Hoek, D., Ramak, R., Roelfsema, J., Mughimi-Gras, L., Kortbeek, T., Pinelli, E. (2017). Diagnosis of intestinal parasites in a rural community of Venezuela: Advantages and disadvantages of using microscopy or RT-PCR. *Acta Tropica* (167), 64-70.
- Li, J., Wang, Z., Karim, M. R., & Zhang, L. (2020). Detection of human intestinal protozoan parasites in vegetables and fruits: a review. *Parasites & vectors*, 13(1), 380. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04255-3>
- Mahdavia, F., Sadrebazzaz, A., Chahardehi, A. M., Badali, R., Omidian, M., Hassanipour, S., & Asghari, A. (2022). Epidemiologia mundial de la infección por *Giardaduodenalisen* pacientes con cancer: revision sistematica y metanalisis. *International health*, 14(1), 5–17. <https://doi.org/10.1093/inthealth/ihab026>
- Meningher, T., Boleslavsky, D., Barshack, I., Tabibian-Keissar, H., Kohen, R., Gur-Wahnon, D., Ben-Dov, I. Z., Sidi, Y., Avni, D., & Schwartz, E. (2019). *Giardia lamblia* miRNAs as a new diagnostic tool for human giardiasis. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(6), e0007398. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007398>
- Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G., & Ey, P. L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular biology and evolution*, 16(9), 1135–1144. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026204>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2019). 1 de cada 3 personas en el mundo no tiene acceso al agua potable, según UNICEF y la OMS [Documento en línea]. Disponible: <https://www.who.int/es/news/item/18-06-2019-1-in-3-people-globally-do-not-have-access-to-safe-drinking-water-%E2%80%93-unicef-who> [Consulta: Octubre 26, 2023].
- Plutzer, J., Ongerth, J., & Karanis, P. (2010). *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International journal of hygiene and environmental health*, 213(5), 321–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.06.005>

- Potes-Morales, C., & Crespo-Ortiz, M. D. P. (2023). Molecular diagnosis of intestinal protozoa in young adults and their pets in Colombia, South America. *PloS one*, 18(5), e0283824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283824>
- Salamandane, C., Lobo, M. L., Afonso, S., Xiao, L., & Matos, O. (2023). Exploring genetic variability of *Giardia duodenalis* and *Enterocytozoon bienersi* in raw vegetables and fruits: implications for food safety and public health in Mozambique. *Frontiers in microbiology*, 14, 1223151. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1223151>
- Sambrook J., y Russell D. (2001). *Clonación molecular, Un manual de laboratorio de tercera edición*. Prensa de laboratorio de Cold Spring Harbor. Nueva York.
- Sánchez, I., Dashti, A., Köster, PC, Bailo, B., González, N., Allende, J., Stensvold, CR, Carmena, D., & González-Barrio, D. (2022). "Desarrollo, optimización y validación de un nuevo método de PCR múltiple en tiempo real para la detección simultánea de *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis* y *Dientamoeba fragilis*". *Patógenos (Basilea, Suiza)*, 11 (11), 1277. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111277>
- Sante Fernández, L., Capón González, P., Moreno Flores, A., Coira Marín, P., & Alonso García, P. (2022). Microscopía vs. biología molecular en el diagnóstico de infecciones protozoarias intestinales, ¿es el momento del cambio? *Revista española de quimioterapia : publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 36(1), 88–91. <https://doi.org/10.37201/req/088.2022>
- Sarria-Guzmán, Y., Chávez-Romero, Y., Bernal, J. E., González-Jiménez, F. E., Serrano-Silva, N., & Fusaro, C. (2022). Molecular identification of *Giardia* spp. in Latin America: An updated systematic review on reports from 2017 to 2021. *Journal of infection in developing countries*, 16(3), 392–401. <https://doi.org/10.3855/jidc.15806>
- Soares, R., & Tasca, T. (2016). Giardiasis: an update review on sensitivity and specificity of methods for laboratorial diagnosis. *Journal of microbiological methods*, 129, 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.017>

- Solaymani-Mohammadi S. (2022). Mucosal Defense Against *Giardia* at the Intestinal Epithelial Cell Interface. *Frontiers in immunology*, 13, 817468. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.817468>
- Sprong, H., Cacciò, S. M., van der Giessen, J. W., & ZOOPNET network and partners (2009). Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS neglected tropical diseases*, 3(12), e558. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000558>
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R. H., Trout, J. M., Schantz, P. M., Das, P., Lal, A. A., & Xiao, L. (2003). Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging infectious diseases*, 9(11), 1444–1452. <https://doi.org/10.3201/eid0911.030084>
- Verweij, J. J., Blangé, R. A., Templeton, K., Schinkel, J., Brienen, E. A., van Rooyen, M. A., van Lieshout, L., & Polderman, A. M. (2004). Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 42(3), 1220–1223. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1220-1223>.
- Verweij, J. J., Schinkel, J., Laeijendecker, D., van Rooyen, M. A., van Lieshout, L., & Polderman, A. M. (2003). Real-time PCR for the detection of *Giardia lamblia*. *Molecular and cellular probes*, 17(5), 223–225. [https://doi.org/10.1016/s0890-8508\(03\)00057-4](https://doi.org/10.1016/s0890-8508(03)00057-4)
- Yoder, J. S., Gargano, J. W., Wallace, R. M., Beach, M. J., & Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2012). Giardiasis surveillance--United States, 2009-2010. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, 61(5), 13–23.
- Watkins, R.R., Eckmann, L. Treatment of Giardiasis: Current Status and Future Directions. *Curr Infect Dis Rep* 16, 396 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11908-014-0396-y>