

Estandarización de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para la detección de *Strongyloides stercoralis* en muestras de materia fecal

Standardization of a real-time polymerase chain reaction (qPCR) for the detection of *Strongyloides stercoralis* in stool samples

Laura F. Campo-Polanco MSc¹, José M. Hernández-Sarmiento PhD²,
Luz E. Botero-Palacio PhD³, Lina A. Gutiérrez-Builes PhD⁴

Introducción: el diagnóstico de estrogiloidiasis se realiza de rutina en los laboratorios clínicos; sin embargo, su detección se dificulta debido a la baja excreción parasitaria y la baja sensibilidad de las pruebas parasitológicas empleadas. **Objetivo:** diseñar y estandarizar una PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de ADN de *Strongyloides stercoralis* en muestras de materia fecal. **Materiales y métodos:** se establecieron las condiciones de qPCR y se evaluaron: a) la especificidad analítica mediante análisis BLASTn de secuencias obtenidas de muestras positivas para *Strongyloides stercoralis*, b) sensibilidad analítica mediante diluciones seriadas de muestras que contenían larvas de *Strongyloides stercoralis* y c) la ocurrencia de reacciones cruzadas con otros parásitos e inhibidores de la

¹ Microbióloga y Bioanalista, MSc en Microbiología y Bioanálisis. Docente de cátedra, Universidad de Antioquia. Investigadora, Grupo de Biología de Sistemas, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia. Correspondencia: Calle 78B #72A-109, Bloque B (cuarto piso). Teléfono: 57 4 4488388 ext. 19-333. Correo electrónico: laura.campolanco@gmail.com

² Médico, MSc y PhD en Ciencias Médicas. Docente, Universidad Pontificia Bolivariana. Investigador, Unidad de Bacteriología y Micobacterias, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Medellín, Colombia.

³ Bacterióloga y Laboratorista Clínica, Especialista en Gerencia en Economía y Finanzas de la Salud, MSc en Ciencias Básicas Biomédicas, PhD en Ciencias Médicas. Docente e investigadora, Grupo de Biología de Sistemas, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.

⁴ Bacterióloga y Laboratorista Clínica, PhD en Ciencias Básicas Biomédicas. Docente e investigadora, Grupo de Biología de Sistemas, Escuela de Ciencias de la Salud, Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia.

Conflicto de intereses: los autores declaran que no tienen conflicto de intereses
Medicina & Laboratorio 2016; 22: 459-478

Módulo 19 (Investigación), número 49. Editora Médica Colombiana S.A. 2016®
Recibido el 18 de septiembre de 2016; aceptado el 07 de octubre de 2016

amplificación. **Resultados:** se amplificó un fragmento de 101 pb del gen 18S del ARN ribosomal. El valor de Ct osciló entre 23 y 29, tomando un Ct ≤ 35 como el punto de corte para muestras positivas. El análisis BLASTn de las secuencias obtenidas mostró un porcentaje de identidad del 98% con secuencias 18S del ARN ribosomal de *Strongyloides stercoralis* reportadas en la NCBI. El límite inferior de detección de la qPCR fue 0,9 ng/ μ L. No se evidenció reacción cruzada con *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Uncinarias*, *Hymenolepis nana*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Giardia intestinalis* e *Iodamoeba bütschlii*. No se detectaron inhibidores en las muestras de materia fecal. **Conclusiones:** la sensibilidad y la especificidad analítica de la qPCR comparado con el examen directo de heces son del 100%; sin embargo, aún no es posible interpretar su utilidad clínica.

Palabras clave: *Strongyloides stercoralis*, estandarización, reacción en cadena de la polimerasa, qPCR, técnicas de diagnóstico molecular.

Introduction: the diagnosis of strongyloidiasis is performing routinely in clinical laboratories; however, its detection is difficult due to low parasitic excretion and low sensitivity of the parasitological tests employed. **Objective:** to design and standardize a real-time PCR (qPCR) for the detection of *Strongyloides stercoralis* DNA in stool samples. **Materials and methods:** qPCR conditions were established and it were assessed: a) analytical specificity by BLASTn analysis of sequences obtained from samples positive for *Strongyloides stercoralis*, b) analytical sensitivity by serial dilutions of samples containing *Strongyloides stercoralis* larvae and c) the occurrence of cross-reactions with other parasites and amplification inhibitors. **Results:** a 101 bp fragment of the 18S ribosomal RNA gene was amplified. The value of Ct ranged from 23 and 29, with a Ct value ≤ 35 as a cut-off point for positive samples. BLASTn analysis of the obtained sequences showed an identity percentage of 98% with 18S ribosomal RNA sequences of *Strongyloides stercoralis* reported in the NCBI. The qPCR lower limit of detection was 0.9 ng/ μ L. There was no cross-reaction with *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Uncinarias*, *Hymenolepis nana*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmanni*, *Giardia intestinalis*, and *Iodamoeba bütschlii*. No inhibitors were detected in the stool samples. **Conclusion:** the sensitivity and analytical specificity of qPCR compared to direct examination of feces are 100%; however, it is still not possible to interpret their clinical utility.

Key words: *Strongyloides stercoralis*, standardization, polymerase chain reaction, qPCR, molecular diagnostic techniques.

Campo-Polanco LF, Hernández-Sarmiento JM, Botero-Palacio LE, Gutiérrez-Builes LA. Estandarización de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para la detección de *Strongyloides stercoralis* en muestras de materia fecal. *Medicina & Laboratorio* 2016; 22: 459-478.