



# Análisis comparativo de metodologías para aislar material genético en muestras fecales humanas

## Comparative analysis of methodologies for isolating genetic material in human fecal samples

GUANO, FREDDY<sup>1</sup>, GALARZA CRISTIAN<sup>1</sup>, RAMOS, MARTHA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador

**Autor de correspondencia**  
fguano7357@uta.edu.ec

**Fecha de recepción**  
10/10/2025

**Fecha de aceptación**  
18/12/2025

**Fecha de publicación**  
02/02/2026

**Autores**  
Guano Carrasco, Freddy Alexander  
Estudiante de Licenciatura en Laboratorio Clínico. Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.  
Correo-e: fguano7357@uta.edu.ec  
ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-7486-924X>  
Ramos Ramírez, Martha Cecilia  
Bioquímica y Química Farmacéutica. Docente e investigadora de la Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.  
Correo-e: marthacramos@uta.edu.ec  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9931-4637>  
Galarza Galarza, Cristian Fernando  
Ingeniero y Master Universitario en Bioinformática, Bioestadística e Ingeniería Biomédica, Ambato, Ecuador  
Correo-e: cf.galarza@uta.edu.ec  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7890-5043>

### Citación:

Guano, F.; Galarza C.; Ramos, M. (2026). Análisis comparativo de metodologías para aislar material genético en muestras fecales humanas. *GICOS*, 11(1), 130-152

DOI:



## RESUMEN

El aislamiento de material genético a partir de muestras fecales humanas es un proceso esencial en los estudios del microbioma intestinal, el diagnóstico molecular y la investigación biomédica. Esta revisión bibliográfica recopila y analiza comparativamente diferentes metodologías de extracción de ADN utilizadas entre 2020 y 2025, considerando el rendimiento, la pureza, la eliminación de inhibidores, el tiempo de procesamiento y la reproducibilidad. Se revisaron protocolos tradicionales basados en fenol-cloroformo y kits comerciales como QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit, DNeasy PowerSoil Pro Kit, NucleoSpin DNA Stool Kit, entre otros. Los resultados indican que los kits comerciales actuales superan ampliamente a los métodos convencionales en eficiencia, seguridad y calidad del ADN obtenido, eliminando la necesidad de pasos mecánicos complejos y solventes tóxicos. Además, se evidencia la importancia de la estandarización de protocolos y controles de calidad en la extracción de ADN fecal para asegurar la comparabilidad entre estudios y laboratorios. Esta revisión destaca la relevancia de optimizar los procedimientos de laboratorio clínico y de investigación molecular, con impacto directo en el diagnóstico y en la comprensión del microbioma humano.

**Palabras clave:** extracción de ADN, inhibidores de PCR, métodos comparativos, microbioma intestinal, muestras fecales.

## ABSTRACT

The isolation of genetic material from human fecal samples is a crucial step in intestinal microbiome studies, molecular diagnostics, and biomedical research. This bibliographic review comparatively analyzes different DNA extraction methodologies published between 2020 and 2025, focusing on yield, purity, inhibitor removal, processing time, and reproducibility. Traditional phenol-chloroform methods and commercial kits such as QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit, DNeasy PowerSoil Pro Kit, and NucleoSpin DNA Stool Kit were evaluated. Findings reveal that modern commercial kits outperform conventional methods in efficiency, safety, and DNA quality, eliminating the need for toxic reagents and complex mechanical disruption. Furthermore, the standardization of extraction protocols and quality controls is essential to ensure inter-laboratory reproducibility. This review underscores the importance of improving laboratory and molecular research procedures to enhance diagnostic accuracy and deepen understanding of the human microbiome.

**Keywords:** DNA extraction, PCR inhibitors, comparative methods, intestinal microbiome, fecal samples.

## INTRODUCCIÓN

El estudio del material genético en heces humanas se ha vuelto relevante en el campo biomédico, ecológico y clínico, en particular para el estudio del microbioma intestinal, el diagnóstico no invasivo de enfermedades gastrointestinales y la vigilancia epidemiológica. La extracción de ADN de estas muestras de manera eficiente y reproducible es un paso crítico para obtener buenos resultados en técnicas posteriores como PCR, secuenciación y análisis metagenómicos. (Tourlousse et al., 2021).

Sin embargo, el aislamiento de ADN de heces se enfrenta a grandes dificultades técnicas relacionadas con la presencia de inhibidores de PCR (sales biliares, polisacáridos complejos, bilirrubina, productos de degradación de hemoglobina, etc.) y la gran heterogeneidad biológica y complejidad de la matriz fecal (Roncancio et al., 2024). En este sentido, es de vital importancia escoger metodologías que maximicen la eliminación de inhibidores y aseguren la calidad y el rendimiento adecuado de ADN (Ramirez et al., 2021).

Ante estas limitaciones, muchos estudios actuales han enfrentado protocolos manuales y kits comerciales de extracción de ADN fecal, analizando la capacidad de remover inhibidores, el rendimiento, la reproducibilidad, el costo y el tiempo de procesamiento. Lim et al. (2020) compararon el rendimiento del QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit con dos versiones antiguas del QIAamp DNA Stool Mini Kit, con y sin el paso adicional de bead-beating. Los resultados demostraron que el nuevo kit produjo mayor concentración de ADN, más puro (índice A260/280 más cercano a 1,8) y una diversidad microbiana similar al protocolo con bead-beating. Esto indica que los kits actuales no solo mejoran la calidad del ADN, sino que eliminan la necesidad de pasos mecánicos adicionales.

Por otro lado, un estudio comparó seis protocolos diferentes en una comunidad microbiana simulada, desde métodos de bajo costo y kits como MP (MagPure Fast Stool DNA KF Kit B), MN (NucleoSpin Soil Kit), ZYMO Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Kit y protocolos manuales de referencia (Q y MetaHIT). Se encontró que los kits fueron significativamente más rápidos (40–100 min vs. 156–380 min) y que el protocolo MP rindió de manera similar al protocolo Q de referencia en términos de rendimiento y diversidad microbiana (Yang et al., 2020).

Tourlousse et al. (2021) en su estudio utilizaron el método MOSAIC con la finalidad de mejorar la reproducibilidad y exactitud de perfiles metagenómicos en heces humanas. Este estudio verificó protocolos de extracción de ADN y construcción de bibliotecas para uso en laboratorio y en campo, sugiriendo estándares que permitan la comparabilidad entre estudios. Por su parte, Fernández et al. (2024) en su investigación ahondaron en cómo protocolos de extracción alteran el rendimiento y la calidad del ADN y la comunidad microbiana metagenómica por Shotgun. La muestra estuvo conformada por 745 muestras fecales de dos cohortes independientes. Se demostró que las diferencias técnicas entre protocolos inducen cambios en los perfiles microbianos que impactan en la fuerza de las asociaciones microbioma-fenotipo.

Desde una perspectiva práctica, Srirungruang et al. (2022) compararon métodos para detectar parásitos

intestinales en heces: fenol-cloroformo convencional con y sin bead-beating (P y PB), QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Q) y QIAamp PowerFecal Pro (QB). Aunque los métodos P y PB rindieron hasta 4 veces más ADN, tuvieron baja tasa de detección por PCR (8,2 %), en tanto que QB logró la mayor tasa (61,2 %) y pudo aislar ADN de todos los tipos de parásitos ensayados. Estos resultados muestran que más ADN no siempre significa mejor rendimiento molecular si todavía existen inhibidores.

En ese contexto, el objetivo de este trabajo es comparar diferentes metodologías para aislar ADN de heces humanas en términos de concentración y pureza del ADN aislado, remoción de inhibidores, tiempo de procesamiento y reproducibilidad entre réplicas. El objetivo es identificar la metodología más eficiente y adecuada para estudios genéticos y metagenómicos que emplean este tipo de muestras, aportando criterios objetivos que orienten la elección del protocolo más conveniente según las necesidades del investigador. Este esfuerzo busca mejorar no solo los métodos de laboratorio, sino también generar datos más fiables y comparables, mejorando la base científica para futuras investigaciones sobre el microbioma humano y la genética molecular.

## METODOLOGIA

### Diseño del estudio

El estudio se llevó a cabo bajo un diseño de revisión sistemática comparativa, con el objetivo de identificar, analizar y comparar los métodos de extracción de ADN en heces humanas. Este tipo de diseño es capaz de reunir y resumir la evidencia científica disponible de una manera sistemática, transparente y reproducible, reduciendo los sesgos asociados con la selección y el análisis de los estudios incluidos.

La revisión sistemática se guio de la guía PRISMA 2020 (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*), que es una guía metodológica estandarizada para planificar, realizar y escribir revisiones científicas. En este diseño, el proceso abarca la identificación del problema de investigación, la búsqueda exhaustiva en bases de datos científicas, la selección de estudios según criterios de inclusión y exclusión predefinidos, la evaluación de la calidad metodológica y la síntesis de los resultados pertinentes (Page et al., 2021)

La naturaleza comparativa de esta revisión surge de la necesidad de evaluar la eficiencia, reproducibilidad y la pureza del ADN aislado por diferentes metodologías de extracción, tanto manuales como kits comerciales. Este diseño hace posible hacer comparaciones y encontrar similitudes entre los métodos reportados en la literatura en términos de especificaciones técnicas como concentración de ADN, índice de pureza, tiempo de procesamiento y capacidad de remoción de inhibidores.

Además, se busca establecer tendencias metodológicas y plantear criterios objetivos para elegir protocolos de extracción de ADN en función de la calidad y utilidad de los resultados. Esta forma de combinar datos cuantitativos y cualitativos fortalece la base metodológica para futuras investigaciones de microbioma y

## Fuentes de información

La evidencia científica para esta revisión sistemática se identificó mediante búsquedas en bases de datos electrónicas académicas y científicas de reconocido prestigio por su amplitud, cobertura e indexación. Estas fuentes dieron acceso a estudios actualizados sobre metodologías de extracción de ADN en heces humanas, asegurando la confiabilidad y pertinencia de los datos obtenidos.

Las bases de datos consultadas fueron PubMed, Scopus, Web of Science, ScienceDirect y Google Scholar. PubMed/MEDLINE: literatura biomédica y molecular revisada por pares; artículos experimentales y comparativos en el área del microbioma intestinal. Scopus y Web of Science arrojaron un abordaje multidisciplinario; se pudieron encontrar estudios desde técnicas de extracción y estandarización de protocolos hasta avances en biología molecular. Se utilizó ScienceDirect para recuperar textos completos de revistas científicas en biotecnología y microbiología aplicada. Finalmente, Google Scholar se usó como fuente suplementaria para encontrar literatura académica relevante no indexada en las bases de datos principales, tales como tesis, informes técnicos y documentos institucionales.

Cada base de datos fue consultada en forma separada, siguiendo su estructura de indexación y operadores de búsqueda. Se priorizaron fuentes que permitan el acceso a artículos científicos revisados por pares, garantizando la integridad académica de la información recopilada.

La combinación de estas herramientas posibilitó la cobertura de todo tipo de publicaciones que describieran metodologías de extracción de material genético, desde métodos manuales clásicos hasta tecnologías automatizadas de purificación y captura magnética. Esta estrategia aseguró una amplia y representativa cobertura de la literatura existente sobre el tema, reforzando la base documental sobre la que se apoya la revisión sistemática.

## Estrategias de búsqueda

La estrategia de búsqueda se formuló para asegurar la exhaustividad, exactitud y reproducibilidad en la identificación de estudios científicos sobre métodos de extracción de ADN en heces humanas. Se siguió un proceso sistemático para localizar, recuperar y organizar la literatura pertinente utilizando palabras clave, operadores booleanos y descriptores normalizados.

La búsqueda se organizó en tres etapas. En la primera, se llevó a cabo una identificación de términos controlados y libres según los descriptores del Medical Subject Headings (MeSH) y del Thesaurus de Scopus para homologar los términos utilizados en las bases de datos. En una segunda fase, se desarrollaron ecuaciones de búsqueda combinando sinónimos, términos variables y conectores lógicos (“AND”, “OR”, “NOT”) para

mejorar la recuperación de información. Finalmente, en la tercera etapa se adaptaron las ecuaciones a las especificaciones de cada plataforma.

Entre las principales expresiones utilizadas se incluyeron combinaciones como:

- “Fecal DNA extraction” OR “stool DNA isolation” AND “human samples”
- “Métodos de extracción de ADN” AND “comparación” AND “microbioma fecal”
- “DNA purification” AND “inhibitors removal” AND “stool samples”
- “Manual protocols” OR “commercial kits” AND “DNA yield” AND “purity”

Estas ecuaciones permitieron abarcar los distintos enfoques metodológicos reportados en la literatura, desde técnicas manuales tradicionales hasta sistemas automatizados de extracción. También se tomaron en cuenta términos relacionados con el rendimiento analítico de los métodos, como rendimiento, pureza, tiempo de procesamiento y reproducibilidad, para asegurarse de que los resultados fueran relevantes.

## Criterios de selección

### *Criterios de inclusión*

Para la selección de los estudios incluidos en esta revisión sistemática, se establecieron criterios que aseguraron la pertinencia, calidad y actualidad de la información científica analizada. Se consideraron únicamente las investigaciones que cumplieron con las siguientes condiciones:

- Artículos publicados entre 2015 y 2025 para así abarcar estudios recientes sobre las metodologías actuales de extracción de ADN.
- Artículos escritos en inglés, español o portugués para reunir evidencia científica de diversos contextos académicos y geográficos.
- Estudios científicos originales o comparativos.
- Estudios que comparen directamente métodos de extracción de ADN a partir de heces humanas, ya sean protocolos manuales o kits comerciales/automatizados.
- Estudios que expliquen detalladamente los métodos de extracción, el tipo de tecnología utilizada y los criterios de evaluación (rendimiento, pureza, tiempo de procesamiento y eliminación de inhibidores).

- Artículos disponibles en texto completo para verificar datos y analizar en profundidad.
- Estudios que proporcionen datos cuantitativos o cualitativos para poder comparar distintas metodologías de aislamiento de material genético.

### *Criterios de exclusión*

Para asegurar la relevancia y calidad metodológica de la información revisada, se definieron criterios de exclusión que permitieron eliminar estudios que no se ajustaran a los objetivos o criterios establecidos para esta revisión sistemática. Se excluyeron los siguientes tipos de documentos y publicaciones:

- Artículos publicados antes del año 2015
- Investigaciones realizadas con muestras no humanas
- Estudios con información incompleta
- Estudios duplicados

### **Proceso de selección de estudio**

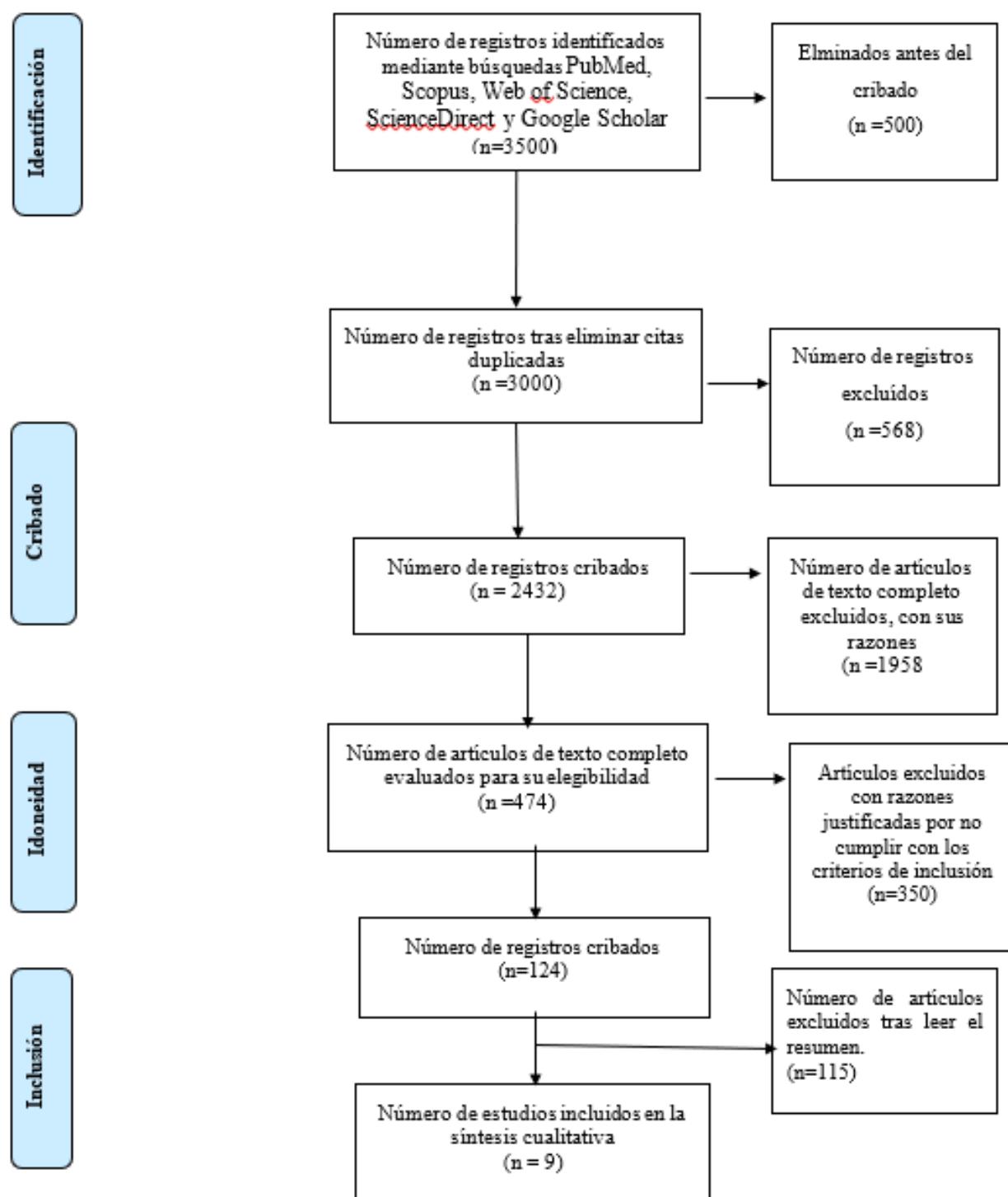
La elegibilidad de los estudios se realizó siguiendo la guía PRISMA 2020, la cual proporciona un marco para la identificación, evaluación y selección de la literatura científica para su inclusión en revisiones sistemáticas. El proceso se llevó a cabo en cuatro etapas principales: identificación, cribado, elegibilidad e inclusión, como se muestra en el diagrama de flujo.

En la etapa de identificación se encontraron 3.500 registros al hacer la búsqueda en las bases de datos PubMed, Scopus, Web of Science, ScienceDirect y Google Scholar. En esta primera fase se descartaron 500 registros por estar fuera del periodo de publicación o por no superar los criterios formales previos al cribado.

Luego, en la etapa de cribado, se eliminaron duplicados, lo que arrojó 3.000 registros únicos. Después de la lectura de títulos y resúmenes, se eliminaron 568 artículos por no ser relevantes para el tema o por falta de información sobre las metodologías de extracción de ADN. Como resultado, 2.432 registros fueron preseleccionados para una revisión más profunda.

En la etapa de elegibilidad, se leyeron los textos completos de los 474 artículos que superaron los criterios iniciales de temática. De ellos, 350 fueron excluidos con justificación documentada, principalmente por no ajustarse a los criterios de inclusión establecidos (tipo de muestra, medidas de evaluación o diseño metodológico). Después de esta eliminación, 124 artículos fueron potencialmente relevantes.

Finalmente, en la etapa de inclusión, se llevó a cabo una lectura y evaluación exhaustiva de los artículos preseleccionados, identificándose 9 estudios que cumplieron con todos los criterios de inclusión y que contaban con información metodológica y resultados comparativos suficientes para la síntesis cualitativa final.



**Figura 1.**

Diagrama PRISMA de la investigación.

#### Extracción de datos

La extracción de datos se llevó a cabo de forma sistemática y estructurada para capturar la información más

relevante y comparable de los estudios incluidos en la revisión. Este proceso se llevó a cabo una vez finalizada la etapa de selección y elegibilidad, asegurando la homogeneidad en la información recogida y organizada de cada artículo científico.

Para ello, se elaboró una matriz de extracción de datos en formato digital (Microsoft Excel) para capturar de manera sistemática los datos más relevantes de cada estudio. Dicha matriz abarcó variables bibliográficas, metodológicas y analíticas para determinar la calidad, eficiencia y reproducibilidad de los diferentes protocolos de extracción de ADN.

Los datos recopilados se categorizaron en las siguientes categorías principales:

- Autor
- Título del estudio
- Objetivo
- Identificación del estudio
- Tipo de metodología utilizada
- Características de la muestra
- Parámetros de evaluación
- Resultados
- Conclusiones

La recolección de datos se realizó de manera manual y doblemente verificada para evitar errores de transcripción o interpretación. En caso de desacuerdo entre los revisores, se discutió el artículo original en conjunto hasta llegar a un acuerdo. Finalmente, los datos extraídos se consolidaron para su posterior análisis cualitativo y comparativo, garantizando la consistencia, la trazabilidad y la transparencia, esenciales para la validez de los resultados en una revisión sistemática.

### **Consideraciones éticas**

La presente investigación se llevó a cabo bajo los principios éticos y de integridad científica para las revisiones documentales. Por ser una revisión sistemática de sólo fuentes secundarias, no se manipularon muestras biológicas humanas ni se involucraron sujetos de investigación, por lo que no se requirió la aprobación de un comité de ética.

Para la realización de la investigación se siguieron los principios éticos de la Declaración de Helsinki y las buenas prácticas científicas para la búsqueda, análisis y comunicación de resultados en la investigación biomédica. Todas las fuentes revisadas fueron públicas o institucionales y de revistas científicas revisadas por

pares, lo que asegura la fiabilidad de la información.

La información obtenida se usó solo para fines académicos y científicos, respetando la confidencialidad de la información y el uso ético de los documentos consultados. Además, se aseguró la reproducibilidad metodológica al documentar cada paso del proceso de búsqueda, selección y análisis de los estudios incluidos, lo que permite su verificación y replicación por otros investigadores.

## RESULTADOS

La siguiente tabla presenta una síntesis de los estudios científicos seleccionados tras la aplicación de los criterios de inclusión definidos en la metodología de la revisión sistemática. Estos trabajos se enfocan en la evaluación comparativa de métodos y protocolos de extracción de ADN a partir de muestras fecales humanas, analizados en el contexto de investigaciones metagenómicas y de secuenciación del gen 16S rRNA.

El propósito de esta tabla es ofrecer una visión estructurada de las principales características de cada estudio, incluyendo el tipo de muestra utilizada, los métodos o kits empleados, los parámetros evaluados, así como los resultados cuantitativos y cualitativos más relevantes. Asimismo, se incluyen las conclusiones y recomendaciones emitidas por los autores, con el fin de identificar patrones de eficiencia, reproducibilidad y precisión entre los diferentes protocolos analizados.

**Tabla 1.***Resumen de los estudios seleccionados.*

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E1	Yang et al. (2020)	<i>Assessment of fecal DNA extraction protocols for metagenomic studies.</i>	Comparativo experimental	Muestras fecales humanas ( $n = 10$ ) y comunidad microbiana control (mock community)	Se evaluaron seis métodos: MagPure Fast Stool DNA KF Kit B (MP), Macherey-Nagel NucleoSpin Soil Kit (MN), Zymo Quick-DNA Fecal/Soil Kit (ZYMO), MOBIO PowerSoil Kit (PS), protocolo manual MetaHIT y el estándar internacional Qiagen Protocol Q.	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L), pureza (A260/280), proporción Gram+/Gram-, rendimiento de ADN fúngico, tiempo de procesamiento (min), costo por muestra, reproducibilidad ( $R^2$ ).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Rendimiento promedio de ADN:</b> 36.2–41.8 ng/<math>\mu</math>L entre protocolos; el MagPure (MP) y el protocolo Q alcanzaron los valores más altos (<math>\approx</math>41.5 ng/<math>\mu</math>L).</li> <li>- <b>Pureza (A260/280):</b> osciló entre 1.82–1.95; los métodos MagPure y Zymo presentaron los mejores valores (~1.92).</li> <li>- <b>Tiempo de procesamiento:</b> MagPure redujo el tiempo total a ~55 minutos, frente a los &gt;90 minutos del protocolo Q.</li> <li>- <b>Sesgo microbiano:</b> PowerSoil (PS) mostró un incremento del 18% en la proporción de bacterias Gram–, mientras que el método MN mejoró la recuperación de ADN fúngico en un 22% respecto al promedio.</li> <li>- <b>Reproducibilidad:</b> todos los métodos presentaron alta correlación interréplica (<math>R^2 &gt; 0.97</math>), con MagPure y Q como los más consistentes.</li> </ul>	El método MagPure Fast Stool DNA KF Kit B igualó el desempeño del protocolo internacional Qiagen Q, ofreciendo una alternativa más rápida y rentable (reducción del 40% en tiempo y 25% en costo por muestra). Se evidenció que el tamaño de las perlas de lisis influye directamente en la eficiencia de recuperación de ADN bacteriano y fúngico. Se recomienda estandarizar el uso de perlas de 0.1–0.5 mm y priorizar métodos con control de inhibidores para estudios metagenómicos de gran escala.

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E2	Fernández et al. (2024)	<i>Choice of DNA extraction method affects stool microbiome recovery and subsequent phenotypic association analyses.</i>	Comparativo experimental multicéntrico	Muestras fecales humanas (n = 745; 292 Life-lines-DEEP y 453 del 500 Functional Genomics Project, Países Bajos)	Comparación entre All-Prep DNA/ RNA Mini Kit (APK) y QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (FSK), ambos de QIAGEN. APK incluyó lisis enzimática + bead-beating, mientras que FSK fue automatizado sin bead-beating.	Concentración y pureza de ADN (ng/µL y A260/280), diversidad alfa y beta, abundancia relativa de taxones, correlación interprotocolos, impacto en asociaciones fenotipo-microbioma.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Rendimiento de ADN (ng/µL):</b> en el cohorte LLD, APK = <math>205.2 \pm 73.3</math> ng/µL, FSK = <math>64.9 \pm 35.7</math> ng/µL (<math>p &lt; 0.001</math>). En 500FG, APK = <math>179.3 \pm 87.8</math> ng/µL, FSK = <math>106.6 \pm 54.9</math> ng/µL (<math>p &lt; 0.001</math>).</li> <li>- <b>Pureza (A260/280):</b> LLD – APK: <math>1.89 \pm 0.05</math> vs FSK: <math>1.99 \pm 0.13</math> (<math>p &lt; 0.001</math>); 500FG – sin diferencias significativas (<math>p = 0.113</math>).</li> <li>- <b>Diversidad microbiana:</b> mayor en APK (Shannon: APK-LLD = <math>3.0 \pm 0.4</math> vs FSK-LLD = <math>2.6 \pm 0.3</math>; <math>p &lt; 0.001</math>).</li> <li>- <b>Diferencias en composición bacteriana:</b> APK mostró mayor abundancia de Firmicutes y Actinobacteria, mientras que FSK favoreció Bacteroidetes y Proteobacteria.</li> <li>- <b>Relación Bacteroidetes/Firmicutes:</b> LLD-APK = 9.79 vs LLD-FSK = 0.97; 500FG-APK = 3.74 vs 500FG-FSK = 0.67 (<math>p &lt; 0.001</math>).</li> <li>- <b>Reproducibilidad:</b> correlación interprotocolo alta (<math>r = 0.85</math> para riqueza de especies; <math>p &lt; 2.2e-16</math>).</li> <li>- <b>Precisión con comunidad simulada (mock):</b> Bray–Curtis: APK = 0.173 vs FSK = 0.466, mostrando que APK refleja mejor la composición real.</li> </ul>	El método AllPrep (APK) mostró una mayor eficiencia y exactitud en la extracción de ADN, especialmente para bacterias Gram positivas. Las diferencias en composición microbiana entre protocolos afectan significativamente los resultados de diversidad y las asociaciones fenotipo-microbioma. Se recomienda incluir un paso de bead-beating y armonizar protocolos en estudios multicéntricos para evitar sesgos en la interpretación metagenómica.

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E3	Rintarhat et al. (2024)	<i>Assessment of DNA extraction methods for human gut mycobiome analysis.</i>	Comparativo experimental	Muestras fecales humanas (n = 6, pacientes con colitis ulcerosa, 22–45 años)	Comparación entre QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, DNeasy PowerSoil Pro Kit y IHMS Protocol Q (manual). Se probaron dos bead-beaters: Mini-Beadbeater-16 (BioSpec, 3450 rpm) y FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals).	Rendimiento de ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), pureza (A260/280), tiempo de procesamiento (min), cantidad de ADN fúngico (Q-PCR, Ct), diversidad $\alpha$ y $\beta$ (Shannon, Chao1), número de taxones únicos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Concentración total (<math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>):</b> IHMS = <math>0.56 \pm 0.33</math>; DNeasy = <math>0.05 \pm 0.02</math>; QIAstool = <math>0.25 \pm 0.09</math> con Mini-Beadbeater.</li> <li>- <b>Pureza (A260/280):</b> DNeasy = <math>1.87 \pm 0.08</math>; IHMS = <math>2.04 \pm 0.06</math>; QIAstool = <math>2.03 \pm 0.09</math></li> <li>. - <b>Tiempo de procesamiento:</b> DNeasy = 42 min; QIAstool = 57 min; IHMS = 196 min.</li> <li>- ADN fúngico detectado por Q-PCR (CTR1): mayor en DNeasy + Mini-Beadbeater (<math>p = 0.025</math>).</li> <li>- <b>Diversidad <math>\alpha</math> (Shannon):</b> tendencia superior con IHMS, sin significancia (<math>p &gt; 0.05</math>).</li> <li>- N° de taxones únicos: IHMS = 12; DNeasy = 10; QIAstool = 4. DNeasy detectó hongos del filo Mucoromycota ausentes en los otros métodos.</li> <li>- <b>Bead-beater:</b> Mini-Beadbeater generó 35% más ADN fúngico que FastPrep y mayor <math>\alpha</math>-diversidad (<math>p &lt; 0.05</math>).</li> <li>- <b>Similitud en comunidad fúngica (PCA):</b> mayor entre muestras con y sin heces al usar DNeasy + Mini-Beadbeater, correlación <math>r \approx 0.92</math>.</li> </ul>	<p>El método DNeasy PowerSoil Pro Kit combinado con Mini-Beadbeater-16 es el más eficiente para la extracción de ADN fúngico de muestras fecales humanas, ofreciendo rendimientos significativamente mayores, procesamiento más rápido y mejor representatividad taxonómica. Aunque IHMS produjo más ADN total, este contenía alto contenido bacteriano y requería casi 5 veces más tiempo. Se propone este método como protocolo estándar (SOP) para estudios del micobioma intestinal humano.</p>

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E4	Xu et al. (2024)	<i>Variation in the metagenomic analysis of fecal microbiome composition calls for a standardized operating approach.</i>	Comparativo multicéntrico de cohortes humanas (n = 2,722).	Muestras fecales humanas (n = 2,722), incluyendo controles sanos y pacientes con EII, cáncer colorrectal, diabéticos tipo 2, OVID-19 y autismo.	Comparación entre Qia- gen DNeasy PowerSoil Kit, Qiagen QIAamp DNA Stool Mini Kit y Promega Maxwell RSC PureFood GMO & Authentication Kit, con y sin pretratamiento con líticasa.	Concen- tración de ADN (ng/ µL), pureza (A260/280), diversidad alfa (Shan- non, Chao1), diversi- dad beta (UniFrac), abundan- cia relativa de taxones (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria), correlación intercohorte ( $R^2$ ), efecto del alma- cenamiento (fresco vs preservante).	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Tamaño total de la cohorte:</b> 2,722 muestras (9 subestudios).</li> <li>- <b>Variación total explicada por el método de extracción:</b> <math>R^2 = 0.095</math>, <math>p &lt; 0.001</math>, mayor que cualquier otro factor (edad, BMI, sitio, almacenamiento).</li> <li>- <b>Concentración de ADN:</b> Promega produjo mayor rendimiento (<math>\approx 40-45</math> ng/ µL) que Qiagen (<math>\approx 30</math> ng/µL). - Pureza (A260/280): Qiagen = <math>2.00 \pm 0.08</math>, Promega = <math>1.86 \pm 0.09</math>; Qiagen generó ADN de mayor calidad.</li> <li>- <b>Riqueza (Chao1):</b> Promega significati- vamente superior (<math>p &lt; 2e-16</math>).</li> <li>- <b>Diversidad (Shannon):</b> estable entre cohortes, pero con sesgo según método (Qiagen &lt; Promega, <math>p &lt; 2e-16</math>).</li> <li>- <b>Abundancia relativa:</b> Qiagen → Bacte- roídeos <math>68.3\% \pm 15.2</math>, Firmicutes <math>24.7\% \pm 9.8</math>; Promega → Firmicutes <math>71.2\% \pm 12.3</math>, Actinobacteria <math>7.8\% \pm 5.4</math>.</li> <li>- <b>Recuperación diferencial:</b> Qiagen subdetectó Actinomyces, Streptococcus y Lactococcus, mientras Promega subde- tectó Bacteroides y Butyricimonas.</li> <li>- <b>Mock community:</b> similitud con composición teórica: Qiagen = 0.064, Promega = 0.086 (distancia UniFrac), mayor fidelidad en Qiagen.</li> <li>- <b>Efecto del almacenamiento:</b> muestras en preservante redujeron la riqueza un 20–30% respecto a las congeladas frescas (<math>p &lt; 0.05</math>).</li> </ul>	<p>La extracción de ADN es el factor técnico que más influye en la variabilidad inter-estudio (<math>\approx 10\%</math>), superando al almacenamiento y variables biológicas.</p> <p>El kit Promega Pure- Food ofrece mayor rendimiento y riqueza, pero menor pureza y precisión taxonómica en gram-negativos. Qiagen garantiza mayor calidad y consistencia, aunque con menor cantidad de ADN. Se recomienda establecer protocolos estandarizados y docu- mentar todos los pasos operativos para mejorar la comparabilidad meta- genómica entre cohortes humanas.</p>

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E5	Elie et al. (2023)	<i>Comparison of DNA extraction methods for 16S rRNA gene sequencing in the analysis of the human gut microbiome.</i>	Comparativo experimental	Muestras fecales humanas (n = 18; 9 sanos y 9 con infección por <i>Clostridium difficile</i> ).	Cuatro métodos: <i>NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel)</i> , <i>DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (QIAGEN)</i> , <i>QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)</i> , <i>ZymoBIO-MICS DNA Mini Kit (ZymoResearch)</i> . Cada uno probado con y sin el Sistema de Preprocesamiento Fecal (SPD, bioMérieux).	Concentración y pureza de ADN (ng/µL, A260/280), integridad (bp), diversidad alfa (Shannon), composición bacteriana (% Firmicutes/Bacteroidetes), distancia composicional (Aitchison), exactitud y reproducibilidad.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Rendimiento (ADN total):</b> SPD + Zymo (S-Z) = <math>5.41 \pm 0.52</math> ng/µL, el más alto (<math>p &lt; 0.05</math>). SPD + MN (S-MN) = <math>4.98 \pm 0.63</math> ng/µL; SPD + DQ (S-DQ) = <math>4.65 \pm 0.70</math> ng/µL. SPD sin aplicar = menor rendimiento en todos los métodos (~3.8 ng/µL).</li> <li>- <b>Pureza (A260/280):</b> S-DQ mostró la pureza óptima (<math>1.80 \pm 0.04</math>), sin contaminación proteica detectable.</li> <li>- <b>Integridad de ADN:</b> S-MN alcanzó los fragmentos más largos (~21.000 bp), superior a QQ y Z (~12.000 bp).</li> <li>- Índice de Shannon: sin diferencias significativas entre sanos y CDI (~4.0–4.2), pero con ligera mejora al aplicar SPD (+5%).</li> <li>- <b>Relación Firmicutes/Bacteroidetes:</b> aumentó de 1.5 a 2.4 con SPD, indicando mejor recuperación de bacterias Gram positivas.</li> <li>- <b>Exactitud composicional (Aitchison distance):</b> S-DQ = 14.05, la menor distancia → mayor precisión taxonómica.</li> <li>- <b>Reproducibilidad interkit:</b> <math>r = 0.91</math> (alta correlación entre réplicas).</li> </ul>	El protocolo S-DQ (SPD + DNeasy PowerLyzer PowerSoil, QIAGEN) presentó el mejor equilibrio entre rendimiento, pureza.

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E6	Siu et al. (2020)	<i>Impact of DNA Extraction Method on Variation in Human and Built Environment Microbial Community and Functional Profiles Assessed by Shotgun Metagenomics Sequencing.</i>	Comparativo experimental (multi-muestra)	Heces humanas (n=6), esputo (n=6) y polvo ambiental (n=6).	Fenol:Cloroformo Promega Maxwell HT 96 gDNA Kit Qiagen MagAttract PowerSoil DNA Kit ZymoBIOMICS 96 MagBead DNA Kit — Todos con el mismo protocolo de bead-beating.	- Rendimiento de ADN (ng/ $\mu$ L) - % lecturas humanas - Índices de diversidad (Simpson, Bray-Curtis, Aitchison) - Abundancia diferencial de especies (FDR <10%) - Contaminación de controles negativos - Costo del método (USD/sample).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Rendimiento ADN (ng/<math>\mu</math>L en heces):</b> Fenol: <math>42.4 \pm 26.1</math>; Promega: <math>26.8 \pm 6.6</math>; Qiagen: <math>10.5 \pm 5.0</math>; Zymo: <math>3.1 \pm 3.4</math>.</li> <li>• % lecturas humanas (<b>heces</b>): 0.3% promedio (vs. 46.9% en polvo, 73.3% en esputo).</li> <li>• <b>Variabilidad en estructura microbiana (heces):</b> método explica 3.0–3.9% de la variabilidad (PERMANOVA, <math>p&lt;0.01</math>).</li> <li>• <b>Variabilidad funcional (heces):</b> 5.4–6.6% de la variación.</li> <li>• <b>Diversidad alfa (Inverse Simpson):</b> sin diferencias significativas (<math>p=0.06</math>).</li> <li>• <b>Sesgo en comunidad mock:</b> Promega mostró menor desviación (Bray-Curtis=<math>0.1066</math> vs. Zymo=<math>0.2159</math>).</li> <li>• <b>Costo (USD/muestra):</b> Fenol: \$3.85; Promega: \$4.12; Zymo: \$5.41; Qiagen: \$6.27.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Promega Maxwell HT 96 gDNA mostró el mejor rendimiento global: alta pureza, reproducibilidad y bajo sesgo.</li> <li>- Fenol: cloroformo produjo rendimientos altos, pero con contaminación en controles negativos.</li> <li>- Las diferencias entre métodos fueron mínimas en heces humanas (&lt;4% de variabilidad), pero mayores en polvo (12–16%).</li> <li>- Recomiendan mantener el mismo método en estudios multimuestra para evitar sesgos interkit.</li> <li>- Para microbioma fecal humano, Promega Maxwell ofrece el mejor balance entre rendimiento y calidad.</li> </ul>

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E7	Costea et al. (2017)	<i>Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies.</i>	Comparativo experimental multacional	Muestras fecales humanas (n=10 adultos sanos; dos muestras A y B homogeneizadas y enviadas a 21 laboratorios).	21 protocolos evaluados: PowerSoil (MoBio), QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen), EZNA Stool Kit (Omega), Maxwell (Promega), MagNAPure (Roche), PSP Stool Kit (Invitek), FastDNA Spin (MP Biomedicals) y protocolos manuales modificados. De los 21, los mejores: Protocol Q (Qia- gen), Protocol H (manual) y Protocol W (fenol-cloroformo).	Cantidad de ADN (ng), fragmentación (<1.8 kb), diversidad (Shan- non), sesgo Gram+/Gram-, reproducibilidad interlab, error de cuantificación (mock), correlación Spearman, distancia Euclíadiana, error absoluto medio (MAE), efecto técnico vs biológico.	<p>- <b>Rendimiento de ADN:</b> diferencias de hasta 100× entre métodos; p.ej., protocolo 18 produjo 100 veces más ADN que los protocolos 3 y 12. - <b>Fragmentación:</b> protocolos 4, 10 y 12 con ADN muy fragmentado (&gt;25%), mientras protocolo 1 no presentó fragmentación. - <b>Variabilidad interprotocolar:</b> explicó hasta &gt;4% de la variación total, mayor que el error de replicación o la preparación de librerías. - <b>Sesgo Gram+/Gram-:</b> 90 de 366 especies significativamente afectadas por el método; <b>Gram+ subestimadas hasta 1.3 log10</b> en abundancia. - <b>Diversidad Shannon:</b> correlacionó positivamente con la fracción Gram+ (<math>r \approx 0.7</math>, <math>p &lt; 0.01</math>); protocolos 3, 11 y 12 presentaron diversidad reducida. - <b>Factores de mejora:</b> bead-beating, zirconia beads y agitación mecánica aumentaron la diversidad; el uso de <b>InhibitEX tablet</b> redujo significativamente el rendimiento. - <b>Reproducibilidad:</b> Protocol H (manual) más reproducible interlab, pero subestimó Gram+. Protocol Q equilibrado entre rendimiento y exactitud. - <b>Exactitud (mock 10 especies):</b> Error absoluto medio (MAE): H = 0.35×; W = 0.39×; Q = 0.42×. - <b>Diferencias biológicas vs técnicas:</b> la extracción de ADN fue el <b>mayor factor técnico</b>, superando el almacenamiento o la variación intraindividual.</p>	<p>El protocolo Q (Qia- gen), derivado de PowerSoil con bead-beating, mostró el mejor equilibrio entre rendimiento, pureza, diversidad y reproducibilidad interlab. Se recomienda Protocol Q como estándar internacional IHMS para extracción de ADN en microbioma fecal humano. La extracción influye más que otros factores técnicos y puede alterar la relación Gram+/Gram- y la diversidad observada; por tanto, la estandarización del protocolo es esencial para comparabilidad en estudios metagenómicos.</p>

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E8	Ange et al. (2018)	<i>Combined bacterial and fungal intestinal microbiota analyses: Impact of storage conditions and DNA extraction protocols.</i>	Comparativo experimental	Muestras fecales humanas (n=3; adultos sanos, 1 hombre y 2 mujeres).	<b>IHMS Protocol Q (QIA-GEN QIAamp Stool Kit)</b> — recomendado por el <i>International Human Microbiota Standards.</i> <b>PowerSoil® MoBio Kit (QIAGEN).</b> Ambos con bead-beating repetido (8 ciclos, 6400 rpm).	- Cantidad y pureza del ADN (ng/µL, A260/280). - Número de OTUs bacterianos y fúngicos. - Diversidad (Shannon, Simpson). - Abundancia relativa de géneros. - Efecto del almacenamiento (-80°C vs RNAlater®). - Análisis multivariante (PCoA, Bray-Curtis).	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Rendimiento de ADN (IHMS vs MoBio):</b> IHMS obtuvo <math>3.2 \times</math> más ADN (<math>p=0.01</math>), rango [1.2–5.1].</li> <li><b>Pureza (A260/280):</b> sin diferencias significativas (<math>p=1.0</math>). • <b>Bacterias detectadas:</b> 41 géneros; 12 “core” (Eubacterium, Roseburia, Ruminococcus, Blautia, etc.).</li> <li><b>Hongos detectados:</b> 40 géneros; <i>Penicillium</i> predominante (&gt;1% en 7/8 muestras).</li> <li><b>Lecturas:</b> 171,869 (bacterias) y 199,089 (hongos).</li> <li><b>Diversidad alfa (Shannon):</b> similar entre protocolos (<math>p&gt;0.05</math>).</li> <li><b>Efecto del almacenamiento:</b> RNAlater redujo la abundancia de 7/41 bacterianos (<i>Roseburia, Clostridium, Streptococcus, etc.</i>) y 6/40 fúngicos (<i>Debaryomyces, Penicillium, Pleurotus</i>).</li> <li><b>Efecto del método de extracción:</b> afectó 18/41 géneros bacterianos y 1 fúngico (<i>Debaryomyces</i>).</li> <li><b>ADN fúngico:</b> más estable con bead-beating repetido.</li> </ul>	El IHMS Protocol Q ofreció el mayor rendimiento de ADN y mejor representación taxonómica bacteriana. El método de extracción influye significativamente en la estructura bacteriana, mientras que el efecto sobre hongos fue mínimo si se usa bead-beating. El almacenamiento en RNAlater® puede alterar ligeramente la abundancia relativa de ciertos géneros, aunque no afecta la diversidad total. Recomendación: usar IHMS Q con bead-beating y preferir congelación inmediata a -80°C para análisis bacteriano y fúngico combinado.

Código del estudio	Autor(es) / Año	Título del estudio	Tipo de estudio	Tipo de muestra	Método o kit de extracción	Parámetros evaluados	Resultados principales	Conclusiones / Recomendaciones
E9	Elie et al. (2020)	<i>A unique and reliable fecal DNA extraction method for 16S rRNA gene and shotgun metagenomic sequencing in the analysis of the human gut microbiome.</i>	Comparativo experimental	Muestras fecales humanas (n=18; 9 sanos y 9 con <i>C. difficile</i> ).	<i>NucleoSpin Soil</i> (Macherey-Nagel) <i>DNeasy PowerLyzer PowerSoil</i> (QIAGEN) <i>QIAamp Fast DNA Stool</i> (QIAGEN) <i>ZymoBIO-MICS DNA Mini Kit</i> (ZymoResearch). Todos probados con y sin Stool Preprocessing Device (SPD, bioMérieux).	Cantidad y calidad de ADN (ng/ $\mu$ L, A260/280), tamaño de fragmento (bp), diversidad alfa (Shannon), proporción Firmicutes/Bacteroidetes, exactitud (distancia Euclíadiana con <i>mock</i> ), repetibilidad (coeficiente de variación).	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Rendimiento (ng/<math>\mu</math>L):</b> SPD + Zymo (S-Z) = <math>5.4 \pm 0.5</math>; SPD + MN = <math>4.98 \pm 0.63</math>; SPD + DQ = <math>4.65 \pm 0.70</math>; SPD + QQ = <math>4.2 \pm 0.6</math>.</li> <li><b>Pureza (A260/280):</b> S-DQ = 1.8 (óptimo); MN y Z &lt; 1.8; QQ ≈ 2.0 (presencia de RNA).</li> <li><b>Tamaño de fragmentos:</b> S-MN = 21,000 bp; DQ y S-DQ ≈ 18,000 bp; QQ ≈ 12,000 bp.</li> <li><b>Diversidad alfa (Shannon):</b> S-QQ, S-MN, S-Z, S-DQ &gt; 4.5 vs. versiones estándar &lt; 4.4 (<math>p &lt; 0.05</math>).</li> <li><b>Relación Firmicutes/Bacteroidetes:</b> aumentó en todos los métodos con SPD (<math>p &lt; 0.01</math>).</li> <li><b>Exactitud (distancia Euclíadiana con <i>mock</i>):</b> menor para S-DQ (mejor predicción), seguida de S-QQ y S-MN.</li> <li><b>Repetibilidad (CV):</b> SPD redujo el CV entre réplicas (de 13.2 a 8.4 en QQ; <math>p &lt; 0.01</math>).</li> <li><b>Proporción de muestras con ADN &gt; 5 ng/<math>\mu</math>L:</b> S-Z (88%), MN (86%), S-QQ (82%), S-DQ (81%).</li> </ul>	<p>El protocolo S-DQ (SPD + DNeasy PowerLyzer PowerSoil, QIAGEN) ofreció el mejor rendimiento global, combinando pureza óptima (A260/280=1.8), diversidad más alta (&gt;4.5), y precisión en abundancias (mínima distancia Euclíadiana).</p> <p>El uso del SPD mejoró todos los indicadores: rendimiento, diversidad, recuperación de Gram+ y reproducibilidad (CV&lt;10). Se recomienda S-DQ como método estándar para extracción de ADN fecal humano en estudios de metagenómica y 16S rRNA.</p>

## DISCUSIÓN

La comparación de los estudios que la integran muestra la gran influencia del método de extracción en la cantidad, pureza y representatividad del ADN aislado de heces humanas. Las diferencias entre protocolos implican cambios en la lisis celular, *bead-beating*, inhibidores y la estandarización de las fases de purificación, las cuales influyen en la fidelidad de los resultados metagenómicos.

Los resultados de Yang et al. (2020) y Fernández et al. (2024) coinciden en que los métodos que incluyen *bead-beating* son superiores en la recuperación de bacterias Gram positivas, tradicionalmente más resistentes a la lisis. Yang et al. (2020) demostraron que el kit MagPure Fast Stool DNA KF B logró rendimientos de hasta 41,8 ng/μL, comparable al protocolo internacional Qiagen Q, pero reduciendo el tiempo y los costos del procedimiento. En consonancia, Fernández et al. (2024) encontraron que el método AllPrep, que utiliza lisis enzimática y bead-beating, rindió hasta 3 veces más ADN que el QIAamp Fast DNA Stool Kit, con mayor diversidad alfa y mejor representación de bacterias del filo Firmicutes.

Por su parte, Rintarhat et al. (2024) se centraron en el microbioma intestinal, y el uso del DNeasy PowerSoil Pro en combinación con el Mini-Beadbeater-16 mejoró en un 35 % el ADN fúngico recuperado y obtuvo una correlación  $>0,9$  entre réplicas, lo que demuestra que el control mecánico de lisis es crucial para recuperar el ADN fúngico. Por ejemplo, Xu et al. (2024) realizaron un estudio multicéntrico de más de 2.700 muestras y determinaron que el método de extracción es el principal factor técnico que determina alrededor del 10% de la variabilidad total del microbioma, más que las variables biológicas o de almacenamiento. En este caso, los kits Qiagen dieron mayor pureza y uniformidad taxonómica, en tanto que Promega dio mayor rendimiento, pero con sesgo hacia bacterias Gram negativas.

Los hallazgos de Elie et al. (2023) y Elie et al. (2020) respaldan la eficacia del protocolo DNeasy PowerLyzer PowerSoil de Qiagen, especialmente cuando se utiliza junto con el SPD. Este método aumentó la pureza del ADN ( $A_{260}/280 = 1.8$ ), la diversidad microbiana (índice de Shannon  $> 4.5$ ) y la reproducibilidad entre réplicas ( $CV < 10\%$ ). Además, el SPD elevó la ratio Firmicutes/Bacteroidetes, indicando una mayor recuperación de bacterias Gram positivas.

Sui et al. (2020) corroboraron estos resultados al analizar distintos tipos de muestras y determinar que el método Promega Maxwell HT 96 gDNA fue el que proporcionó mejor rendimiento y calidad en heces humanas, aunque la variabilidad interkit se mantuvo en un 4 %. Estos hallazgos subrayan la importancia de la homogeneidad metodológica en estudios comparativos.

En una perspectiva de mayor alcance, Costea et al. (2017) demostraron que la extracción de ADN constituye la principal fuente de variación técnica entre laboratorios internacionales. En este estudio, en el que se compararon 21 protocolos, se encontró que el Protocol Q de Qiagen es el protocolo de referencia para la extracción de ADN fecal humano, por su capacidad para lograr un equilibrio entre rendimiento, pureza y reproducibilidad inter laboratorio. Además, Angebault et al. (2020) demostraron su superioridad sobre el protocolo PowerSoil, rindiendo 3,2 veces más y preservando mejor la estructura bacteriana sin modificar la diversidad fúngica.

En conjunto, los resultados comparados indican que los métodos combinados de lisis mecánica por *bead-beating* y purificación química controlada son los más eficientes y reproducibles. Entre ellos, los protocolos basados en la tecnología Qiagen, como el S-DQ (SPD + DNeasy PowerLyzer PowerSoil) de Elie et al. (2020) y el Protocol Q (IHMS) de Costea et al. (2020), son las estrategias más robustas. Ambos son muy puros ( $A_{260}/280 \approx 1,8$ ), con buen rendimiento (4–5 ng/ $\mu$ L) y mayor fidelidad taxonómica, disminuyendo la variación técnica inter ensayo.

Por lo cual, analizando en conjunto todos los estudios examinados, el método S-DQ (SPD + DNeasy PowerLyzer PowerSoil, Qiagen) es el que mejor resultado global obtiene, al conseguir un buen equilibrio entre rendimiento, pureza, diversidad y reproducibilidad. Su aplicación es un paso adelante hacia la estandarización de la extracción de ADN fecal humano, necesaria para mejorar la comparabilidad y la validez de los estudios metagenómicos futuros.

## CONCLUSIONES

La comparación de los estudios analizados permitió determinar que la metodología utilizada para la extracción de ADN de heces humanas es uno de los principales factores técnicos que influyen en la calidad, cantidad y representatividad del ADN aislado. La revisión sistemática mostró que las variaciones en las etapas de lisis celular, remoción de inhibidores y purificación influyen en la microbiota que se detecta y, por lo tanto, en los análisis metagenómicos posteriores.

En cuanto a rendimiento y pureza, los métodos que combinan la lisis mecánica por *bead-beating* con una purificación química controlada fueron los mejores. Entre ellos, los kits comerciales de Qiagen, en concreto el protocolo S-DQ (Stool Preprocessing Device + DNeasy PowerLyzer PowerSoil), lograron el mejor equilibrio en concentración de ADN, pureza ( $A_{260}/280 \sim 1,8$ ), diversidad microbiana y reproducibilidad interensayo. Este protocolo, junto con el Protocol Q del International Human Microbiota Standards, se establece como protocolo de referencia en estudios metagenómicos por su capacidad de generar resultados reproducibles entre laboratorios.

Los datos recopilados también reafirman que el *bead-beating* es necesario para una buena recuperación de bacterias Gram positivas y hongos, grupos a menudo infravalorados en protocolos que omiten este paso. Además, la automatización con sistemas de captura magnética o pretratamiento estandarizado disminuye la variabilidad técnica, acelera el tiempo de procesamiento y mejora la reproducibilidad, lo cual es crucial en estudios a gran escala.

Por otro lado, se encontró que una mayor cantidad de ADN no siempre implica un mejor rendimiento molecular, ya que los inhibidores pueden afectar la eficiencia de amplificación y la interpretación de los perfiles microbianos. En este contexto, la calidad funcional del ADN (su capacidad de amplificarse de manera reproducible) es un criterio más importante que la cantidad producida.

Finalmente, la comparación de métodos y la evidencia de estudios multicéntricos confirman la necesidad

de protocolos estandarizados de extracción de ADN fecal humano. La implementación de metodologías verificadas, como el protocolo S-DQ o el IHMS Protocol Q, mejorará la comparabilidad de los estudios, reducirá la variabilidad técnica y fortalecerá la evidencia científica en la que se basan los estudios del microbioma y la genética molecular humana.

## CONFLICTO DE INTERESES

Se declara que no existe conflicto de intereses en la elaboración de este trabajo de investigación.

## REFERENCIAS

- Angebault, C., Ghozlane, A., Volant, S., Botterel, F., d'Enfert, C., & Bougnoux, M. (2018). Combined bacterial and fungal intestinal microbiota analyses: Impact of storage conditions and DNA extraction protocols. *PLOS ONE*, 13(8). doi:10.1371/journal.pone.0201174
- Arana, A., Curto, M., Rodríguez, E., & Ransanz, E. (2024). Extracción de ADN como estrategia didáctica para aprender sobre la célula en Educación Primaria y Secundaria. *Revista Internacional para la Calidad Educativa*, 4(1), 36-60. doi:10.55040/educa.v4i1.79
- Costea, P. I., Zeller, G., Sunagawa, S., Pelletier, É., Alberti, A., Levenez, F., Tramontano, M., Driessen, M., Hercog, R., Jung, F.-E., Kultima, J. R., Hayward, M. R., Coelho, L. P., Allen-Vercoe, E., Bertrand, L., Blaut, M., Brown, J. R. M., Carton, T., Cools-Portier, S.,... Ehrlich, S. D. (2017). Towards standards for human fecal sample processing in metagenomic studies. *Nature Biotechnology*, 35(11), 1069–1076. https://doi.org/10.1038/nbt.3960
- De la Torre, A., Rodríguez, J., & Aroca, S. (2023). Condiciones para la toma de muestras de heces. *Revista Científica Arbitrada Multidisciplinaria PENTACIENCIAS*, 5(6), 526-530. doi:10.59169/pentaciencias. v5i6.873
- Elie, C., Perret, M., Hage, H., Sentausa, E., Hesketh, A., Louis, K., Fritah-Lafont, A., Leissner, P., Hervé C., Reynier, F., Gervasi, G., & Saliou, A. (2023). Comparison of DNA extraction methods for 16S rRNA gene sequencing in the analysis of the human gut microbiome. *Scientific Reports*, 13(10.1038/s41598-023-33959-6).
- Elie, C., Perret, M., Louis, K., Fritah-Lafont, A., Leissner, P., Vachon, C., Rostaing, H., Reynier, F., Gervasi, G., & Saliou, A. (2020). A unique and reliable fecal DNA extraction method for 16S rRNA gene and shotgun metagenomic sequencing in the analysis of the human gut microbiome. *Research Square Preprint*. doi:10.21203/rs.3.rs-52279/v1
- Fernández, A., Sinha, T., Gacesa, R., Andreu, S., Gois, M., Gelderloos, J., Jansen, D., Kruk, M., Jaeger, M., Joosten, L., Netea, M., Weersma, R., Wijmenga, C., Harmsen, H., Fu, J., Zhernakova, A., & Kurilshikov, A. (2024). Choice of DNA extraction method affects stool microbiome recovery and subsequent phenotypic association analyses. *Scientific Reports*, 14(1), 3911. doi:10.1038/s41598-024-54353-w
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. (2012). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1). doi:10.1093/nar/gks808
- Lim, M., Park, Y., Kim, J., & Do, Y. (2020). Evaluation of fecal DNA extraction protocols for human gut microbiome studies. *BMC Microbiol*, 20(212). doi:10.1186/s12866-020-01894-5
- Page, M., McKenzie, J., Bossuyt, P., Boutron, I., Hoffmann, T., Mulrow, C., & Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *bmj*, 372. doi:10.1136/bmj.n71
- Ramarez, D., Solana, E., & Licea, A. (2021). Integrated DNA Extraction Protocol to Avoid PCRInhibitors from Fecal and Environmental Samples for Next-Generation Sequencing. *Biomedical Journal of Scientific*

& Technical Research, 37(3), 29493-29499. doi:10.26717/BJSTR.2021.37.006014

Rintarhat, P. C., Koh, H., Park, S., Lee, E. J., Lim, H., Noh, J., Lee, D., & Jung, W. (2024). Assessment of DNA extraction methods for human gut mycobiome analysis. *Royal Society Open Science, 11*. doi:10.1098/rsos.231129

Roncancio, N., García, J., Rivera, N., Gonzalez, A., & López, D. (2024). Comparison of DNA quantity and quality from fecal samples of mammals transported in ethanol or lysis buffer. *One Health, 18*. doi:10.1016/j.onehlt.2024.100731

Silgado, A., Sulleiro, E., Serre-Delcor, N., y Bartolomé, R. (2022). *Enfermedad de Chagas crónica: estrategias de mejora del diagnóstico molecular y alternativas al cribado serológico convencional* [Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona]. <https://ddd.uab.cat/record/275509>

Srirungruang, S., Mahajindawong, B., Nimitpanya, P., Bunkasem, U., Ayuyoe, P., Nuchprayoon, S., & Sanprasert, V. (2022). Comparative Study of DNA Extraction Methods for the PCR Detection of Intestinal Parasites in Human Stool Samples. *Diagnostics, 12*(11), 2588. doi:10.3390/diagnostics12112588

Sui, H., Weil, A., Nuwagira, E., Qadri, F., Ryan, E., Mezzari, M., Phipatanakul, W., & Lai, P. (2020). Impact of DNA extraction method on variation in human and built environment microbial community and functional profiles assessed by shotgun metagenomics sequencing. *Frontiers in Microbiology, 11*. doi:10.3389/fmicb.2020.00953

Tourlousse, D., Narita, K., Miura, T., Sakamoto, M., Ohashi, A., Shiina, K., Matsuda, M., Miura, D., Shimamura, M., Ohyama, Y., Yamazoe, A., Uchino, Y., Kameyama, K., Arioka, S., Kataoka, J., Hisada, T., Fujii, K., Takahashi, S., Kuroiwa, M... Terauchi, J. (2021). Validation and standardization of DNA extraction and library construction methods for metagenomics-based human fecal microbiome measurements. *Microbiome, 9*(95). doi:10.1186/s40168-021-01048-3

Vásquez, C., Leyton-Carcaman, B., Cid-Alda, F., Segovia, I., Pinto, F., & Abanto, M. (2023). Physical pretreatments applied in three commercial kits for the extraction of high-quality DNA from activated sewage sludge. *International Journal of Molecular Sciences, 24*(20). doi:10.3390/ijms242015243

Xu, Z., Yeoh, Y., Tun, H., Fei, N., Zhang, J., Morrison, M., Kamm, M., Yu, J., Leung, F., & Ng, S. (2024). Variation in the metagenomic analysis of fecal microbiome composition calls for a standardized operating approach. *Microbiology Spectrum, 12*(12). doi:10.1128/spectrum.01516-24

Yang, F., Sun, J., Luo, H., Ren, H., Zhou, H., Lin, Y., Han, M., Chen, B., Liao, H., Brix, S., Li, J., Yamg, H., Kristiansen, K. & Zhong, H. (2020). Assessment of fecal DNA extraction protocols for metagenomic studies. *Gigascience, 9*, 1-12. [https://pdfs.semanticscholar.org/d3a8/21638a24884d598d1096509aa4924c8b0ec4.pdf?utm\\_source=chatgpt.com](https://pdfs.semanticscholar.org/d3a8/21638a24884d598d1096509aa4924c8b0ec4.pdf?utm_source=chatgpt.com)

Yuan, S., Cohen, D., Ravel, J., Abdo, Z., & Forney, L. (2012). Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One, 7*(3). doi:10.1371/journal.pone.0033865