

# Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*

## Evaluation of bacterial DNA extraction methods in fecal samples of patients diagnosed with *Helicobacter pylori* infection

Aracely García Cuan<sup>1</sup>  
Anny Miranda Cárdenas<sup>2</sup>

Recibido: 14/09/2017

Aceptado: 26/01/2018

Publicado: 02/05/2018

**Correspondencia:**

agarcia@unilibrebaq.edu.co  
anny\_sp91@hotmail.com

DOI: <https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.2.4996>

Cómo citar: García Cuan A, Miranda Cárdenas A. Evaluación de métodos de extracción de ADN bacteriano en muestras fecales de pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*. *Biociencias* [Internet]. 2nov.2018 [diaMes.año];13(2):7-6. Available from: <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/biociencias/article/view/4996>

### Open Access



@Copyright: Revista Biociencias 2018

### Resumen

La identificación de microorganismos a través de técnicas moleculares ha tomado gran popularidad en los últimos años gracias a su precisión. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de diagnóstico molecular sumamente valorada por su rapidez de resultados, alta sensibilidad y especificidad, sin embargo, el rendimiento de esta técnica dependerá de la calidad del ADN extraído. Las muestras fecales contienen una gran cantidad de sustancias, como sales que pueden comportarse como inhibidores para la PCR, por esta razón, se llevó a cabo este estudio donde se evaluaron algunas modificaciones a técnicas de extracción de ADN bacteriano por medio de la metodología fenol-cloroformo en 10 muestras fecales tomadas de pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori* en el departamento del Atlántico. En el método final se obtuvo una concentración promedio de ADN de 1.501,0 ng/μl.

**Palabras Clave:** Extracción de ADN, *Helicobacter pylori*, muestras fecales, purificación.

### Abstract

The identification of microorganisms through molecular techniques has become very popular in recent years due to their accuracy. The Polymerase Chain Reaction (PCR) is a molecular diagnostic technique highly valued for its rapidity of results, high sensitivity and specificity, however, the performance of this technique depends on the quality of the extracted DNA. Fecal samples contain a large number of substances, such as salts that may behave as inhibitors for the PCR, for this reason, this study evaluated some modifications to bacterial DNA extraction techniques of the phenol-chloroform methodology in 10 fecal samples taken from patients diagnosed with infection by *Helicobacter pylori* in the Department of Atlántico, Colombia. In the final method an average DNA concentration of 1,501.0 ng/μl was obtained.

**Keywords:** DNA extraction, *Helicobacter pylori*, fecal samples, purification.

<sup>1</sup> Magíster en Biología Molecular y Biotecnología, docente investigadora Universidad Libre, líder del grupo Investigación en Microbiología y Biotecnología IMB. [agarcia@unilibrebaq.edu.co](mailto:agarcia@unilibrebaq.edu.co)

<sup>2</sup> Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas, joven investigadora de Colciencias y miembro del grupo Investigación en Microbiología y Biotecnología, Triple A S.A. E.S.P.. [anny\\_sp91@hotmail.com](mailto:anny_sp91@hotmail.com)

## Introducción

Tradicionalmente, la identificación de microorganismos en laboratorio se ha llevado a cabo de manera rutinaria mediante el aislamiento del microorganismo problema y la observación de sus características fenotípicas expresadas, como su morfología, comportamiento bioquímico y metabolismo (1,2). Sin embargo, esta metodología presenta varias limitaciones, por ejemplo, el tiempo para obtener resultados o la dificultad que presentan algunos microorganismos para ser cultivados, como es el caso de los microorganismos extremófilos o las Bacterias denominadas Viables No Cultivables (BVNC) (3).

Los métodos de identificación de microorganismos por medio de técnicas moleculares son una opción altamente viable para la eliminación de estos limitantes, ya que proveen soluciones en términos de costo y rapidez para la obtención de resultados. Dichas técnicas utilizan ADN aislado para identificar y confirmar de forma certera la presencia o ausencia de los microorganismos (1,3). Entre ellas encontramos la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR, una técnica de diagnóstico molecular sumamente valorada por su rapidez de resultados, alta sensibilidad y especificidad, que evita, en gran medida, la cantidad de falsos positivos y negativos durante la etapa de diagnóstico (4). No obstante, el desempeño la PCR depende fundamentalmente de la calidad de la muestra a analizar, es decir del ADN, el cual, debe ser de alta calidad y pureza, por esto son necesarias técnicas especializadas y estandarizadas para la extracción de ADN de buena calidad.

Existe una cantidad considerable de metodologías de extracción de ADN bacteriano, algunas de ellas son: salting, que utiliza altas concentraciones de sales para la lisis celular (5); Chelex 100, una resina quelante que no requiere una digestión previa con enzimas como la proteínasa K (6); y la metodología fenol-cloroformo o extracción con solventes orgánicos que se fundamenta en la lisis celular y el solventes orgánicos para la eliminación de restos proteicos y lipídicos presentes (5). Esta diversidad permite seleccionar la técnica que mejor se ajuste a las necesidades de cada investigador teniendo en cuenta varios factores, como la cantidad de la muestra con la que se cuenta para realizar la extracción, la cantidad de ADN que se requiere o matriz de la muestra o su origen. Las muestras fecales se recomienda la metodología de fenol-cloroformo para las extracciones de ADN en muestras fecales (7,8), debido al buen rendimiento que se obtiene utilizando poca cantidad de muestra y a la obtención de gran cantidad de ADN de buena calidad (5), por esto, generalmente se recomienda se recomienda la metodología de fenol-cloroformo para las extracciones de ADN en muestras fecales (7,8), debido a su alta capacidad de eliminación de sales, al buen rendimiento que se obtiene utilizando poca cantidad de muestra y a la obtención de gran cantidad de ADN de buena calidad (5).

En este estudio se evalúan dos técnicas de extracción pertenecientes a la metodología fenol-cloroformo en 10 muestras fecales tomadas a pacientes del Atlántico, Colombia diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Toma de muestras

Se tomaron muestras a 10 pacientes diagnosticados con infección por *Helicobacter pylori*, los cuales asistieron a las unidades endoscópicas de la Clínica de la Costa Ltda. y al Centro de Video-Endoscopia Digestiva (CEVID) en la ciudad de Barranquilla, para participar en un procedimiento de endoscopia y toma de biopsia. Dichos pacientes debieron cumplir con los siguientes criterios: tener entre 3 y 69 años, presentar un diagnóstico positivo o negativo de enfermedad gástrica y estar diagnosticados con infección por *Helicobacter Pylori*. Se excluyó a aquellos pacientes que hubiesen recibido antibioticoterapia (por cualquier causa) en los últimos 3 meses o que al momento del estudio recibieran quimioterapia, radioterapia o padecieran cualquier tipo de cáncer. Por último, se almacenaron las muestras recolectadas a 4 °C hasta el día de la extracción.

### 2.2 Preparación de la muestra y extracción de ADN

Se realizaron 2 repeticiones con cada paciente para los métodos evaluados y se preparó la muestra según Conde, Revolo y Espada (8).

#### 2.2.1 Preparación de la muestra

De cada muestra se tomó 1 g que se adicionó a un tubo de 15 ml que contenía 1 ml de Buffer PBS, y se llevó a Vortex hasta homogenizar completamente. Después, se centrifugó la muestra a 2.000 rpm durante 2 minutos para precipitar los restos de alimentos, luego, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se centrifugó de nuevo a 13.000 rpm durante 5 minutos, en esta ocasión se descartó el sobrenadante. Este último lavado se repitió una vez más y se conservó el pellet para cada extracción.

### 2.3 Evaluación preliminar de métodos sugeridos por la literatura

Se evaluaron los métodos sugeridos por Conde, Revolo y Espada (8); y López y Mejía (9) en cinco muestras de heces humanas.

#### Método sugerido por Conde, Revolo y Espada

Se lavó el pellet conservado con 1.000 µL de buffer fosfato salino, se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante, por último, se realizó esta operación una vez más. Luego, el pellet lavado se resuspendió con 500 µL de agua ultra pura estéril y 10 µL de SDS (Sodio Dodecil Sulfato) al 10 %, se puso esta suspensión a baño maría durante 10 minutos a 100 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó 1,0 volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos, se repitió este lavado dos veces y en cada lavado se transfirió la capa acuosa superior a un nuevo tubo. Por último, se precipitó el ADN con 1,0 volumen de isopropanol frío, se volvió a centrifugar esta vez durante 10 minutos a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 50 µL de agua ultra pura estéril.

### **2.3.1 Método sugerido por López y Mejía**

El pellet conservado se resuspendió en 50 µL de SDS 10 % (p/v) y 50 µL de buffer de lisis (50 mM TrisHCl, 50 mM EDTA pH 8, 1 % SDS y 50 mM NaCl) y se puso en un agitador Vortex hasta resuspender por completo. Luego, se incubó la suspensión durante 30 minutos a 37 °C y después se agregaron 2,0 volúmenes de fenol; se mezcló vigorosamente todo y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo teniendo cuidado de no recoger la película de proteína, después se adicionó 1,0 volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó de nuevo. A continuación, se transfirió una vez más la fase acuosa a otro tubo y se adicionaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío; se mezcló todo suavemente por inmersión y se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm. Se descartó el etanol y se dejó secar el pellet por completo. Finalmente, se resuspendió el ADN en 100 µL de agua ultra pura estéril.

### **2.4 Evaluación de métodos planteados**

Teniendo en cuenta los resultados preliminares de cantidad y pureza leídos en un espectrofotómetro Nanodrop 2000, se escogió el método sugerido por Conde, Revolo y Espada, al que se le aplicaron las modificaciones relacionadas a continuación.

#### **2.4.1 Método modificado N° 1**

Se resuspendió el pellet con 50 µL de agua buffer de lisis (50 mM TrisHCl, 50 mM EDTA pH 8, 1 % SDS y 50 mM NaCl) + 50 µL de SDS al 10 % y 5 µL de lisozima, luego se incubó esta suspensión a 37 °C durante 30 minutos. Después, se dividió cada muestra en dos tubos para centrifuga de 5 mL, se agregaron 2,0 volúmenes de fenol-cloroformo a cada muestra y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. Se repitió este lavado dos veces y en cada lavado se transfirió la capa acuosa superior a un nuevo tubo, unificando las muestras cuando fuera posible. Por último, se precipitó el ADN con 1,0 volumen de isopropanol frío, se volvió a centrifugar, esta vez durante 10 minutos a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 50 µL de agua ultra pura estéril.

#### **2.4.2 Método modificado N ° 2**

Se resuspendió el pellet conservado con 50 µL de agua buffer de lisis (50 mM TrisHCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% SDS y 50mM NaCl) + 50 µL de SDS al 10 % y 50 µL de lisozima, se incubó esta suspensión a 37 °C durante 10 minutos, luego se puso a baño maría durante 30 minutos a 100 °C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después, se dividió cada muestra en dos tubos de centrifuga de 5 ml y se agregaron 2,0 volúmenes de fenol-cloroformo a cada una; se centrifugó todo a 13.000 rpm por 5 minutos y se transfirió la capa acuosa superior a un nuevo tubo, unificando las muestras cuando fuera posible. Por último, se precipitó el ADN con 1,0 volumen de isopropanol frío, se volvió a centrifugar esta vez durante 10 minutos a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 50 µL de agua ultra pura estéril.

### 2.4.3 Calidad, cantidad y pureza del ADN extraído

Se leyó cada ADN extraído en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 —que arroja la cantidad de ADN de cada muestra— y se evaluó la relación A260/A280 para determinar su pureza en cuanto a la cantidad de proteínas y sales contenidas. Para determinar la calidad del ADN extraído, se puso cada muestra en cámara de electroforesis con gel de agarosa al 2 % a 80 voltios durante 1 hora y 20 minutos.

## 3.Resultados

La evaluación de la pureza, calidad y cantidad obtenidas son las variables claves para definir el protocolo más confiable para la extracción de ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos con cada método se resumen en la Tabla N° 1.

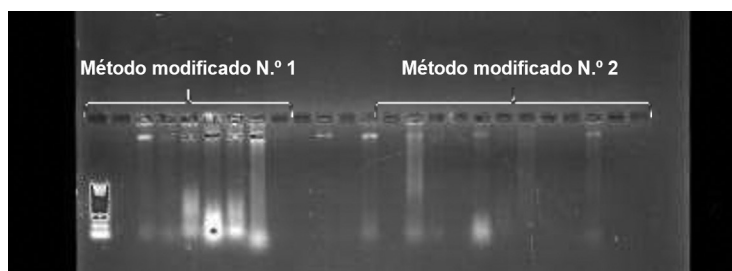
**Tabla N° 1.** Cuantificación y medición A260/A280 del ADN obtenido a partir de las muestras fecales.

Espectrofotometría			
Protocolo	Concentración		
	A260	Relación A260/A280	de ADN (ng/μl)
Método modificado N.º 1	18,9	1,6	946,2
Método modificado N.º 2	5,0	1,7	1.501,0

Fuente:Propia del autor.

Las mediciones en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 revelan que utilizando el Método modificado N° 2 se obtuvo una mayor cantidad de ADN (1.501 ng/μl), así como una pureza más aceptable en las lecturas de la relación A260/A280 en comparación con el Método modificado N.º 1. En la Imagen N° 1, se puede observar el corrido electroforético realizado en las extracciones de ambas muestras evaluadas, en donde se evidencia una mejor calidad de bandas para el Método modificado N° 2.

**Imagen N° 1.** Corrido electroforético de los métodos de extracción modificados.



Fuente:Propia del autor

## Discusión

Los métodos evaluados mostraron un buen comportamiento, con ambos se obtuvo una gran cantidad de ADN (promedios de 946,2 ng/μl y 1.501,0 ng/μl) y una buena pureza (relación A260/A280 de 1,6 y 1,7 respectivamente). No obstante, al someter los ADN extraídos a un corrido electroforético se evidenció que el método modificado N° 2 tuvo una mejor estabilidad durante el proceso, lo cual puede deberse a la cantidad de sales presentes en las muestras tratadas con el método modificado N° 1, al cual se le hicieron menos lavados.

El método de extracción por fenol-cloroformo es una alternativa más económica y sencilla en comparación con cualquier kit comercial. Además, se puede realizar en un menor tiempo, si se le compara con un cultivo microbiano convencional. El ADN extraído tiene la calidad óptima para ser aplicado a una metodología de PCR.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a los pacientes por su participación en la investigación y a las instituciones de salud: Clínica de la Costa, Clínica del Caribe y el Centro de Video-Endoscopia Digestiva (CEVID) por el aval para la recolección de la información, a los financiadores del proyecto: Gobernación del Atlántico, Sistema General de Regalías (SGR) y Universidad Libre.

## Referencias bibliográficas

1. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: Ventajas y limitaciones. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2014; 31(3):535-46.
2. Fernández A, García C, Saéz J, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In: Procedimientos en Microbiología Clínica. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;:45-52.
3. Tamagnini LM, Paraje MG. ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? Rev Fac Ciencias exactas, Físicas y Nat. 2015 Sep; 2(2):99-102.
4. Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González C., Ayala-Labarríos L., Rocha-Revilla J., Padilla-García V, Espinosa-Hernández T. Detección de Microorganismos Mediante Métodos Moleculares. AQM Rev Divulg científica [Internet]. 2009; 1(1). Disponible en: [https://d4611d6c-a-62cb3a1a-s-sites.googlegroups.com/site/umaunefm/archivos-de-microbiologia-1/M%C3%A9todos%20moleculares.pdf?attachauth=ANoY7cqD\\_mfkObU1erm3R1ITmr5p9CONcuRaphlbFDP2JgLPqJ-Zt4RRnSLEa-Pazu9IJGNLVi2dWEY\\_PsWXdQl4tYmqBvrXVa\\_PB7tMHTMc1rx5qpK24Cygwqtyev7f3gC0FhWaia-3BQ6oXgxrY-Kt02RPIj7azA8wSN5Liqi1fH5FtJRlzl2yUi343IF5OL8EHwA2dKwMWAerXlkjch-Cp5Ar3\\_ugDTouprutE5UmydFT6j7GQL4zihrvJgR6uphSrv64YUzBNvC2lvR-WXJFt0QaRNzuWz-yA%3D%3D&attredirects=0](https://d4611d6c-a-62cb3a1a-s-sites.googlegroups.com/site/umaunefm/archivos-de-microbiologia-1/M%C3%A9todos%20moleculares.pdf?attachauth=ANoY7cqD_mfkObU1erm3R1ITmr5p9CONcuRaphlbFDP2JgLPqJ-Zt4RRnSLEa-Pazu9IJGNLVi2dWEY_PsWXdQl4tYmqBvrXVa_PB7tMHTMc1rx5qpK24Cygwqtyev7f3gC0FhWaia-3BQ6oXgxrY-Kt02RPIj7azA8wSN5Liqi1fH5FtJRlzl2yUi343IF5OL8EHwA2dKwMWAerXlkjch-Cp5Ar3_ugDTouprutE5UmydFT6j7GQL4zihrvJgR6uphSrv64YUzBNvC2lvR-WXJFt0QaRNzuWz-yA%3D%3D&attredirects=0)

5. Payares N, Mancilla L. ADN de alta calidad a partir de sangre total almacenada por largo tiempo para amplificación por PCR. *Cienc & Salud*. 2012; 1(1): 29–34.
6. García L, Rodrigo J, Sánchez P, Ramos S, Suarez C. Extracción de adn con resina chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinomas de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2004 Mr ;55(3):139–144. DOI: 10.1016/S0001-6519(04)78497-6
7. Sandoval-Arias SM. Extracción de ADN humano mediante dos métodos para la tipificación forense a partir de muestras fecales en papel FTA. *TM [internet]* 1nov.2014 [citado 20jun.2017]; 27(4): 14-21. Disponible en: [https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/2081](https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/2081)
8. Conde M, Revolo S, Espada A. Implementación de la técnica reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de Salmonella y Shigella directamente de muestras fecales. *Biofarbo*. 2006 dic;14(14): 67–75.
9. López L, Mejía C. Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Rev. MVZ Córdoba [Internet]*. 2012; 17(3):3169–75. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69325096011>