

ARTÍCULO ORIGINAL

## *Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de Giardia lamblia*

NORA B. MOLINA\*, DANIELA POLVERINO\*, MARTA C. MINVIELLE\*, MARÍA APEZTEGUÍA\*\*,  
MARIO AGUILAR\*\*\* y JUAN A. BASUALDO\*

### COMPARISON OF LYSIS METHODS AND DNA EXTRACTION OF *Giardia lamblia* TROPHOZOITES

*The efficiency of lysis procedures and DNA purification treatments of Giardia lamblia trophozoites were evaluated regarding the breaking-up efficiency, quantity and pureness of DNA, processing time and costs. Five lysis methods (distilled water and heating; distilled water, heating and proteinase K; buffer D Lysis; buffer E lysis, and commercial kit), and three DNA purification methods (phenol:chloroform:isoamlic, Chelex 100 and commercial kit) were tested. The obtained data were statistically analyzed. The buffer E lysis and Chelex combination was simple and economic method which produced high DNA performance with low pureness. Commercial kit was simple and expensive method which generated low yields of DNA with appropriate purity level for molecular analysis.*

**Key words:** *Giardia lamblia*, DNA extraction, lysis.

### INTRODUCCIÓN

*Giardia lamblia* (sinónimos: *G. intestinalis*, *G. duodenalis*) es el protozoo intestinal productor de diarrea no bacteriana diagnosticado con más frecuencia en todo el mundo, afectando principalmente a niños de países desarrollados y en desarrollo<sup>1,2</sup>. El diagnóstico convencional se realiza por observación microscópica o por detección de antígenos o anticuerpos. Ambos métodos tienen sus limitaciones<sup>3</sup>. El desarrollo de métodos moleculares ha creado la necesidad

de implementar técnicas simples y eficientes de extracción de ADN.

El aislamiento de ADN de alto peso molecular, intacto y con el menor número de contaminantes es esencial para la aplicación de técnicas moleculares tales como RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), hibridización, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), PFGE (electroforesis en gel de campo pulsante), Southern blot, ADN microarrays y construcción de biblioteca genómica<sup>4</sup>.

\* Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

\*\* Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Argentina.

\*\*\* Instituto de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Correspondencia a: Juan A. Basualdo: Cátedra de Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

60 y 120 s/n, CP 1900, La Plata, Argentina., E-mail: jabasua@atlas.med.unlp.edu.ar, Tel.: +54-221-425-8987; Fax: +54-221-425-8987.

Existe abundante bibliografía sobre la extracción y purificación de ácidos nucleicos de protozoos<sup>5-11</sup>. No obstante, los protocolos standards y métodos comerciales disponibles en la actualidad no presentan patrones de rendimiento homogéneos<sup>12</sup>. En consecuencia, es fundamental determinar el sistema de extracción y purificación de ácidos nucleicos más adecuado para cada tipo de muestra.

Para optimizar la metodología de extracción de ADN, se compararon distintos procedimientos de lisis y purificación de ácidos nucleicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia de cinco protocolos de lisis y tres métodos de purificación de ADN de trofozoítos de *G. lamblia*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Parásitos:** Se partió de un cultivo en fase exponencial de una línea clonal de trofozoítos de *G. lamblia* (GS/M-83-H7) en medio TYI-S-33 modificado cedido gentilmente por el Dr. Pablo Pérez del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, CIDCA). Los parásitos se desprendieron de la superficie mediante la incubación en hielo por 10 min. Los trofozoítos fueron cosechados mediante centrifugación a 1.000 g por 3 min a 4° C<sup>13</sup> y lavados una vez con PBS frío. El pellet fue resuspendido en solución fisiológica estéril y se realizó el recuento de trofozoítos en Cámara de Neubauer, por triplicado. Los parásitos se fraccionaron en viales con 10<sup>9</sup> trofozoítos cada uno y se conservaron a -80° C hasta su utilización. Cada vial se descongeló rápidamente, se centrifugó a 5.000 g por 5 min. El sobrenadante fue removido y el pellet se resuspendió en 200 µl de solución fisiológica estéril. A cada alícuota de trofozoítos se le realizó el recuento en Cámara de Neubauer antes y después de cada procedimiento de ruptura<sup>5</sup>.

**Lisis de Trofozoítos:** Cada alícuota con 200 µl de trofozoítos se procesó para la ruptura de los mismos mediante cinco métodos. Cada protocolo se realizó por triplicado y las muestras se conservaron a -20° C hasta la purificación de ADN.

En el método 1, se mezcló la alícuota de trofozoítos con agua destilada (AD) en partes iguales y se hirvió durante 45 min. En el método 2, se procedió de igual forma que en el método 1

y posteriormente se le adicionó proteinasa K (1 mg/ml), se incubó a 60°C durante 24 h y luego se hirvió por 15 min. En el método 3, los trofozoítos se mezclaron 1:1 con buffer de lisis D (NaCl 0,15 M, EDTA 100 mM, SDS 0,5%, proteinasa K 1 mg/ml), se incubaron a 60°C por 24 h y se hirvieron 15 min<sup>14</sup>. En el método 4, se mezclaron 1:1 con buffer de lisis E (Tris-HCl 100 mM, EDTA 100 mM, SDS 2%, NaCl 0,2 M, Mercaptoetanol 1mM, proteinasa K 1 mg/ml), se incubaron a 60°C por 24 h y se hirvieron 15 min<sup>15</sup>. Para el método 5, se utilizó el miniKit Qiagen® de spin-columns (QIAamp DNA stool minikit, Cat. 51504).

**Purificación de ADN:** Los trofozoítos lisados por los métodos 1 al 4, fueron sometido a dos procesos de purificación de ADN:

- A) Purificación con solventes orgánicos (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico) (25:24:1), precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio (0,3 M), lavado en etanol 70% y disolución con agua (100 µl)<sup>16</sup>.
- B) Resina Chelex 100 (Biorad®). Cada muestra se mezcló con igual volumen de una suspensión acuosa de resina Chelex 100 al 5% y se realizó un ciclo de calentamiento: 98° C 10 min en el termociclador (Techne Thechgene)<sup>6</sup>. El sobrenadante fue precipitado en etanol absoluto y resuspendido en agua (100 µl).

Con los trofozoítos lisados por el método 5 se continuó la extracción según protocolo del fabricante (QIAamp DNA stool minikit).

La eficiencia de los protocolos de lisis se evaluó sobre la base de los porcentajes de ruptura celular de cada tratamiento. Los métodos de purificación de ADN fueron evaluados analizando la concentración de ADN obtenido por Absorbancia a 260 nm (Espectrofotómetro Shimadzu, UV-visible) y la pureza se evaluó según el cociente 260/280.

**Análisis estadístico:** Para comparar el porcentaje de lisis entre los diferentes métodos se utilizó Análisis de Varianza de un factor y Bonferroni. Para identificar los métodos de extracción que presentaron diferencias se utilizó Análisis de Varianza de dos factores y Bonferroni. El método 5 se analizó por contrastes.

## RESULTADOS

Las técnicas de ruptura de trofozoítos evaluadas en este trabajo difirieron entre sí en la

**Tabla 1. Porcentajes de ruptura de trofozoítos de *Giardia lamblia*. Comparación de cinco métodos de lisis**

Protocolos de lisis	Proteinasa k	Tiempo de procesamiento (horas)	% de ruptura de trofozoítos <sup>(b)</sup>
Agua Destilada	No	1	89,98 (1,02)
Agua Destilada	Sí	25	94,78 (0,86)
Buffer D <sup>(c)</sup>	Sí	25	99,16 (0,04)
Buffer E <sup>(c)</sup>	Sí	25	99,98 (0,02)
Kit QIAamp	Sí <sup>(a)</sup>	0,5	99,95 (0,05)

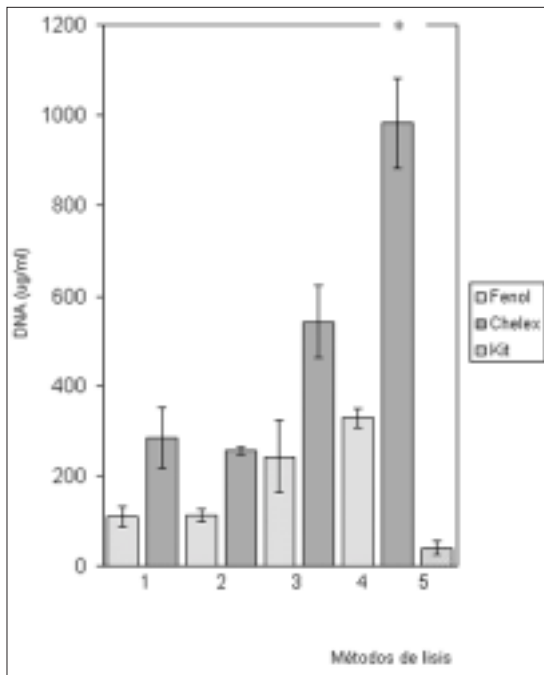
(a) provisto por el kit

(b) el valor indicado es el promedio y el desvío estándar para tres muestras independientes

(c) ver composición en Materiales y Métodos

eficiencia de lisis y en el tiempo requerido para procesar cada muestra. Estos tiempos y los porcentajes de ruptura se muestran en la Tabla 1. El análisis estadístico de los porcentajes de lisis reveló que los métodos 3, 4 y 5 no presentaron diferencias entre sí. Los métodos 1 y 2 fueron significativamente menores que los demás ( $p = 0,000$ ).

Cuando se compararon los 2 métodos de



**Figura 1.** Comparación de la concentración de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia* obtenido según la combinación del método de lisis y purificación de ADN. Los valores son medias de tres muestras con sus desvíos standards. 1: Agua destilada y calor, 2: Agua destilada, calor y proteinasa K, 3: Buffer D y proteinasa K, 4: Buffer E y proteinasa K, 5: kit comercial. \* estado.

purificación de ADN, el protocolo de la resina Chelex mostró el mayor rendimiento de ADN, independientemente del método de lisis utilizado. Las concentraciones de ADN obtenidas con la combinación de los métodos de lisis 1 al 5 y los métodos de purificación se muestran en la Figura 1.

La pureza se evaluó sobre la base de los cocientes de absorbancias 260/280 (Tabla 2). El método 5 difirió del método 1 ( $p = 0,002$ ), del método 2 ( $p = 0,044$ ) y del método 3 ( $p = 0,002$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de la resina Chelex + buffer E y el QIAamp DNA stool minikit.

El protocolo de purificación con fenol demandó aproximadamente 2 días, la técnica con Chelex, una hora y el kit comercial requirió 3 horas de proceso. El análisis de los costos reveló que cualquier combinación de métodos de lisis y purificación analizados en este trabajo tuvo un valor inferior a 2 dólares/muestra, excepto

**Tabla 2. Cocientes 260/280 del ADN obtenido mediante distintos métodos de lisis y extracción**

Extracción de ADN	Método lisis	260/280 (Ratio) Promedio	SD
Chelex	1	1,17	0,10
Chelex	2	1,43	0,18
Chelex	3	1,17	0,06
Chelex	4	1,41	0,19
Fenol	1	1,27	0,05
Fenol	2	1,46	0,09
Fenol	3	1,34	0,02
Fenol	4	1,73	0,03
Kit*	5	1,75	0,13

\* Estadísticamente significativo.

el QIAamp DNA stool minikit cuyo costo fue de 9 dólares/muestra.

## DISCUSIÓN

En este estudio se compararon cinco protocolos de lisis y tres de purificación de ADN de trofozoítos de *G. lamblia* respecto a la eficiencia de ruptura, cantidad y pureza de ADN. Se realizó, además, un análisis de tiempos y costos de procesamiento de los métodos empleados.

Respecto a la eficiencia de lisis, los métodos 1 y 2 permitieron procesar las muestras en menos de 1 h aunque presentaron los menores porcentajes de ruptura. Los métodos 3, 4 y 5 mostraron altos porcentajes de lisis pero los tiempos de procesamiento difirieron ampliamente desde 30 min a 24 h. Por lo tanto, para procesar un gran número de muestras en cortos tiempos, las mejores opciones fueron el método 1 (AD y calor) y el 5 (QIAamp DNA stool minikit). En relación a los costos, evidentemente el método 1 fue más económico aunque su rendimiento de lisis resultó inferior al 5.

Los tres protocolos de purificación realizados (Chelex, Solventes orgánicos y QIAamp DNA stool minikit) difirieron en cantidad y pureza de ADN, tiempos de procesamiento y costos.

La técnica de Resina Chelex mostró la mayor eficiencia de recuperación de ADN con un coeficiente 260/280 mayor de 1,0. Su uso redujo la manipulación de las muestras, minimizando las posibles contaminaciones accidentales durante la extracción de ADN. Presentó la ventaja de ser una técnica económica, sencilla y rápida.

El procedimiento comercial tuvo bajo rendimiento de ADN con elevado índice de pureza. Fue el protocolo más costoso pero su tiempo de realización fue breve. Su principal limitación fue el volumen inicial de muestra a diferencia de los otros métodos que permitirían partir de mayores volúmenes de muestra.

La purificación con solventes permitió obtener cantidades de ADN intermedias entre los otros dos métodos. A diferencia del kit comercial, es un procedimiento económico. Nuestro análisis concuerda con el de otros<sup>17</sup>, concluyendo que la extracción con solventes orgánicos requiere mayor tiempo y manipulación, siendo tedioso el procesamiento de un gran número de muestras. En la bibliografía consultada<sup>12</sup> se reportan

resultados variables, donde se observa mayor recuperación de ADN de semen utilizando un kit comercial (QIAamp tissue Kit, Qiagen®) respecto a la purificación con fenol. Así se ha reportado que el kit comercial utilizado (Instagene Matrix®) para la extracción de ADN de *T. cruzi* tuvo la menor recuperación y el menor índice de pureza, comparado con los métodos del Salting out y el de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) seguido de extracción con solventes<sup>18</sup>. También se han evaluado distintos protocolos de purificación de ADN de tejidos y concluyeron que el método de Chelex es seguro, simple, más efectivo y económico que los otros métodos, incluido el kit comercial QIAamp DNA minikit (Qiagen®)<sup>19</sup>. Por otra parte, también se ha reportado una mayor recuperación de ADN al procesar muestras plasmáticas mediante el método de KingFisher respecto al Kit QIAamp DNA Midi reagent set (Qiagen®)<sup>20</sup>. Todos estos resultados son difíciles de comparar con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo debido a la diversidad de las muestras procesadas y a la utilización de diferentes kits comerciales. Otros investigadores trabajando con *E. coli* publicaron que el rendimiento promedio de ADN fue menor con el kit QIAamp DNA stool minikit (Qiagen®) que cuando utilizaron Heat Lysis protocol<sup>21</sup>. Sin embargo, los cocientes 260/280 para el kit fueron mayores que para el otro método, coincidiendo con nuestros resultados.

Todos los métodos de lisis ensayados reportaron un porcentaje de lisis mayor al 90%. Los tres protocolos de purificación realizados (resina Chelex, Solventes orgánicos y QIAamp DNA stool minikit) difirieron en cantidad y pureza de ADN, tiempos de procesamiento y costos.

En conclusión, la lisis de trofozoítos de *G. lamblia* con el método 4 (buffer E) y la purificación de ADN con resina Chelex resultó un método simple, económico que permitió recuperar grandes cantidades de ADN con bajo índice de pureza. El QIAamp DNA stool minikit fue un método simple, más costoso que produjo bajas cantidades de ADN con un nivel de pureza apropiado para estudios moleculares.

## RESUMEN

Se evaluó la eficiencia de procedimientos de lisis y tratamientos de extracción de ADN de

trofozoítos de *Giardia lamblia* respecto a la eficiencia de ruptura, cantidad y pureza de ADN, además de los tiempos de procesamiento y costos. Se testearon cinco métodos de lisis (agua destilada y calor; agua destilada, calor y proteinasa K; buffer de lisis D; buffer de lisis E y un kit comercial) y tres métodos de purificación de ADN (fenol:cloroformo: isoamílico; Chelex 100 y un kit comercial). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente. La combinación de buffer de lisis E y Chelex fue un método simple y económico, que produjo alto rendimiento de ADN con baja pureza. Esta técnica comercial fue un método simple, más costoso que produjo bajas cantidades de ADN con un nivel de pureza apropiado para estudios moleculares.

## REFERENCIAS

- 1.- ADAM R. The biology of *Giardia* spp. Microbiol Rev 1991; 55: 706-32.
- 2.- ELIGIO GARCÍA L, GALVÁN S C, JIMÉNEZ CARDOSO E. Distancia filogenética de aislados de *Giardia intestinalis* de niños sintomáticos y asintomáticos. Rev Invest Clin 2002; 54: 113-8.
- 3.- GHOSH S, DEBNATH A, SIL A, et al. PCR detection of *Giardia lamblia* in stool: targeting intergenic spacer region of multicopy rRNA gene. Mollecular and Cellular Probes 2000; 14: 181-9.
- 4.- AUSUBEL F, BRENT R, KINGSTON R, et al. editors. Short Protocols in Molecular Biology. Compendium of Methods from Current protocols in Molecular Biology. Second Edition. Harvard Medical School. 1992.
- 5.- TROLL H, MARTI H, WEISS N. Simple Differential Detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Fresh Stool Specimens by Sodium Acetate-Acetic Acid Formalin Concentration and PCR. J Clin Microbiol 1997; 35: 1701-5.
- 6.- DOWD S E, GERBA C P, ENRIQUEZ F J, PEPPER I L. PCR Amplification and Species Determination of Microsporidia in Formaline-Fixed Feces after Immunomagnetic Separation. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 333-6.
- 7.- IONAS G, FARRANT K J, MCLENACHAN P A, et al. Species Differentiation of *Giardia* by PCR. 1998. OECD Workshop Molecular Methods for Safe Drinking Water. Interlaken'98.
- 8.- BASZLER T V, GAY L J C, LONG M T, MATHISON B A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in Fetal Tissues from Spontaneous Bovine Abortions. J Clin Microbiol 1999; 37: 4059-64.
- 9.- CARNEVALE S, VELÁZQUEZ J N, LABBÉ J H, et al. Diagnosis of *Enterocytozoon bienersi* by PCR in stool Samples eluted from Filters Paper Disks. Clin Microbiol Rev 2000; 7: 504-6.
- 10.- BIENZ M, SILES-LUCAS M, WITTEWER P, MULLER N. *vsp* Gene Expression by *Giardia lamblia* clone GS/M-83-H7 during Antigenic Variation In Vivo and In Vitro. Infect Immun 2001; 69: 5278-85.
- 11.- GUY R A, PAYMENT P, KRULL U J, HORGREN P A. Real-Time PCR for Quantification of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Environmental Water Samples and Sewage. Appl Environ Microbiol 2003; 69: 5178-85.
- 12.- GREENSPOON S A, SCARPETTA M A, DRAYTON M L, TUREK S. QIAamp Spin Columns as a Method of DNA Isolation for Forensic Casework. J Forensic Sci 1998; 43: 1024-30.
- 13.- SOUSA M C, POIARES-DA-SILVA, J. Characterization of Human Isolates of *Giardia lamblia* from Portugal. Int J Infect Dis 2004; 8 suppl 1. p 218.
- 14.- POLVERINO D, MOLINA NB, MINVIELLE M C, et al. Técnicas de purificación y ruptura de quistes de *Giardia* spp. Rev Arg Microbiol 2004; 36: 97-100.
- 15.- PELAYO L, FRAGA J, NÚÑEZ F A, et al. Genetic characterization by random amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of 18 isolates of *Giardia lamblia* obtained from day care children. Exp Parasitol 2003; 104: 162-6.
- 16.- SAMBROOK J, RUSSELL D. Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA. 2001.
- 17.- DENG M Q, CLIVER D O. Rapid DNA extraction methods and new primers for randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Giardia duodenalis*. J Microbiol Methods 1999; 37: 193-200.
- 18.- BRUSÉS B L, LUCERO H, AGUIRRE M V, GORODNER J. Comparación de técnicas de extracción de DNA para la detección de *Trypanosoma cruzi* mediante la técnica de PCR. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2000 (cited 2004). Available from: URL: [http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/3\\_medicas/m\\_pdf/m\\_011.pdf](http://www.unne.edu.ar/cyt/2000/3_medicas/m_pdf/m_011.pdf).
- 19.- COOMBS N J, GOUGH A C, PRIMROSE J N. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucl Acid Res 1999; 27: i-iii.
- 20.- STEMMER C, BEAU-FALLER M, PENCREAC'H I E, et al. Use of Magnetic Beads for Plasma Cell-free DNA Extraction: Toward Automation of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics. Clinical Chemistry 2003; 49: 1953-5.
- 21.- GIOFFRÉ A, MEICHTRI L, ZUMARRAGA M, et al. Evaluation of a QIAamp DNA stool purification kit for Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* detection in bovine fecal swabs by PCR. Rev Arg Microbiol 2004; 36: 1-5.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de La Plata y la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.