

DETECCIÓN RÁPIDA DE *Campylobacter jejuni* EN POLLOS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA ANIDADA

A rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chickens by nested polymerase chain reaction

Karim L. Jiménez^{1,2}, Amparo I. Zavaleta¹, Victor Izaguirre¹, Ysabel Koga², Javier Soto³

RESUMEN

Con el objetivo de estandarizar un método rápido para la detección de *C. jejuni* en pollos se tomaron hisopados cloacales de 50 pollos de 7 semanas de edad en diferentes mercados del distrito de Lima. Se extrajo el ADN por solventes orgánicos y se detectó la presencia de *C. jejuni* mediante la reacción en cadena de la polimerasa anidada utilizando cebadores específicos para los genes ribosómicos 16S y gen *hipO*. Paralelamente, utilizando métodos de filtración bacteriológicos convencionales se aisló *C. jejuni* en medios selectivos. Los métodos rápido y convencional permitieron detectar *C. jejuni* en el 48/50 (96%) y 29/50 (58%) de las muestras analizadas, respectivamente. Los hallazgos de este estudio indican que el método rápido tiene mayor sensibilidad que el convencional.

Palabras clave: *C. jejuni*, PCR anidada, genes ribosómicos 16S, gen *hipO*, pollos.

SUMMARY

In order to standardize a rapid method for detecting *C. jejuni* in chickens, it was taken cloacal swabs from 50 chickens of seven-week lifetime belonging to several markets of Lima's city. DNA was extracted by using organic solvents and the presence of *C. jejuni* was detected by means of Nested-PCR using specific primers for 16S ribosomal and *hipO* genes. In parallel with this rapid DNA-based approach, it was isolated *C. jejuni* by conventional filtration bacteriological methods and selective culture mediums. The rapid and conventional methods used in this study, detected *C. jejuni* in 48/50 (96%) and 29/50 (58%) respectively. These findings indicate than the rapid method has a higher sensitivity than the conventional one.

Key words: *C. jejuni*, Nested-PCR, 16S ribosomal genes, *hipO* gen, chickens.

INTRODUCCIÓN

Campylobacter jejuni es el principal agente causal de la gastroenteritis humana denominada campilobacteriosis, responsable de aproximadamente 450 millones de casos por año a nivel mundial¹, en algunos casos produce complicaciones neurológicas, como el síndrome de Guillain-Barré que es un desorden desmielinizante que afecta nervios periféricos causando parálisis progresiva².

El tracto digestivo de las aves es el hábitat natural de *Campylobacter jejuni*, las cuales las transportan en forma asintomática. Se ha reportado que el 80% de canales y vísceras que se comercializan en los centros de abasto se encuentran contaminados por *Campylobacter jejuni* y se estima que más del 70% de los casos de campilobacteriosis están asociados a la manipulación de pollos crudos o la ingestión de carne insuficientemente cocida³.

¹ Lab. de Biología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 1- Perú. E-mail: azavaletap@unmsm.edu.pe

² Bioservice S.R.L., Lima 7- Perú.

³ Hospital Nacional Docente Madre-Niño "San Bartolomé", Lima 1- Perú

Morfológicamente, son bacilos Gram negativos que presentan flagelos en uno o en ambos extremos. Así mismo, frente a una exposición prolongada al medio ambiente, a cambios bruscos de temperatura o en cultivos de más de 72 horas, adquieren formas esféricas u ovoides perdiendo la capacidad para multiplicarse en medios de cultivo, pudiendo retornar a su forma bacilar si es que son nuevamente inoculadas en células animales⁴.

Se dispone de métodos microbiológicos para el aislamiento e identificación de esta bacteria; sin embargo, se requieren medios de cultivos específicos y condiciones exigentes, los cuales son costosos y demandantes de tiempo, dificultando su aplicación en el análisis de rutina en países en vías de desarrollo. Bang y col. han desarrollado procedimientos de muestreos sistemáticos y métodos de detección rápida en base a los genes ribosómicos 16S e *hipO*⁵. En el género *Campylobacter*, el gen *hipO* que codifica la hipuricasa está presente únicamente en *C. jejuni*^{6,7}; sin embargo, se ha reportado la presencia de cepas hipurato negativas en el 5 al 10% de aislados⁸, por lo tanto, se requiere de metodologías rápidas, sensibles y específicas para la identificación de este patógeno.

El objetivo del presente estudio fue estandarizar la reacción en cadena de la polimerasa anidada en base a los genes ribosómicos 16S e *hipO* para la detección de *C. jejuni* en hisopados rectales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestra. Se tomaron muestras por hisopado cloacal de 50 pollos de 38 a 42 días de edad de diferentes mercados del distrito de Lima. Las muestras se transportaron hasta el laboratorio bajo refrigeración en el medio Amies.

Método de filtración. Se empleó el agar Mueller Hinton suplementado con carbón activado y desoxicolato de sodio. Adicionalmente, se incluyó el factor de aerotolerancia que contenía metabisulfito de sodio, piruvato de sodio, sulfato ferroso y cefalotina (30 µg/mL).

Los hisopos se hidrataron con 300 µL de PBS. Las placas con agar se secaron en la estufa a 37 °C por dos horas para facilitar la absorción del líquido y se colocó un filtro de nitrocelulosa de 0.45 µm sobre la superficie del medio de cultivo. Se dispensó 200 µL de la suspensión del hisopado conteniendo las bacterias sobre la membrana de nitrocelulosa y

se incubó a 42 °C por 30 minutos, transcurrido el tiempo, el filtro se eliminó y las placas se incubaron a 42 °C por 48 horas en una jarra de anaerobiosis con vela encendida y una tableta de efervescente comercial dentro de una bolsa de polipropileno con 10 mL de agua destilada.

Identificación bacteriológica. En una lámina porta objeto se resuspendió una colonia en 20 µL de caldo MH estéril y se observó al microscopio a 100X de aumento. Todos los aislados obtenidos se identificaron por las reacciones de oxidasa, catalasa, hidrólisis del hipurato de sodio y la susceptibilidad al ácido nalidíxico y cefalotina.

Extracción de ADN en muestra directa. El ADN se extrajo a partir de la suspensión del hisopado cloacal y de los cultivos purificados por el método de fenol/cloroformo descrito por Maniatis y col.⁹

Reacción en cadena de la polimerasa anidada. Se amplificaron los genes *ribosómicos 16S* e *hipO*. Las secuencias de los cebadores y las condiciones de PCR usadas en la reacciones se presentan en la Tabla 1.

La mezcla final de reacción contenía un volumen de 25 µL de KCl 50 mM, Tris/HCl 10 mM (pH 8.4 a 25 °C), triton X-100 0.1 % (v/v), MgCl₂ 1.5 mM, 200 µM de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGT, dTTP), 25 pmoles de cada cebador y *Taq* ADN polimerasa 1U (Invitrogen). Las condiciones de cada ciclo de reacción programadas en un termociclador (Perkin Elmer 2400) fueron: desnaturalización a 94 °C durante 45 s, hibridación de acuerdo a las características de los cebadores y al gen a amplificar y polimerización a 72 °C durante dos minutos. Estas condiciones se repitieron durante los 35 ciclos y al final se incubó a 72 °C durante 7 min. En todos los casos se consideraron controles negativos de la reacción de PCR sin añadir ADN molde. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X a 80 V. Posteriormente, el ADN se coloreó con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV.

RESULTADOS

Aislamiento de *Campylobacter* spp. El método de filtración con el medio Mueller Hinton modificado y suplementado con cefalotina permitió el crecimiento de colonias características del género *Campylobacter* en el 58% (29/50) de los hisopados cloacales analizados. La visualización directa al

microscopio mostró la presencia de bacilos móviles con giros sobre su propio eje, conocido como movilidad en sacacorchos. Únicamente se consideraron aquellos aislados que presentaron reacción positiva a las pruebas de oxidasa, catalasa, hipurato de sodio y mostraron resistencia a ácido nalidíxico y cefalotina.

Extracción del ADN. El método fenol/cloroformo empleado permitió la obtención del ADN, tanto del hisopado cloacal como de cultivos puros, con alto grado de pureza y concentración como se observa en la Fig. 1.

presencia de *Campylobacter jejuni* por esta variante de la PCR, evidenciando la alta sensibilidad de la técnica molecular empleada.

En la Fig. 2 se muestra la corrida electroforética de los productos de la PCR anidada del gen ribosómico 16S. Las líneas 2 y 4 corresponden al fragmento de 1495 pb que se encuentra en todas las especies del género *Campylobacter*. La línea 2, muestra una baja concentración de ADN; sin embargo, es suficiente para la segunda reacción de PCR donde los fragmentos de 833 pb correspondientes a *Campylobacter jejuni* y *C. coli* se muestran muy intensos en las líneas 3 y 5.

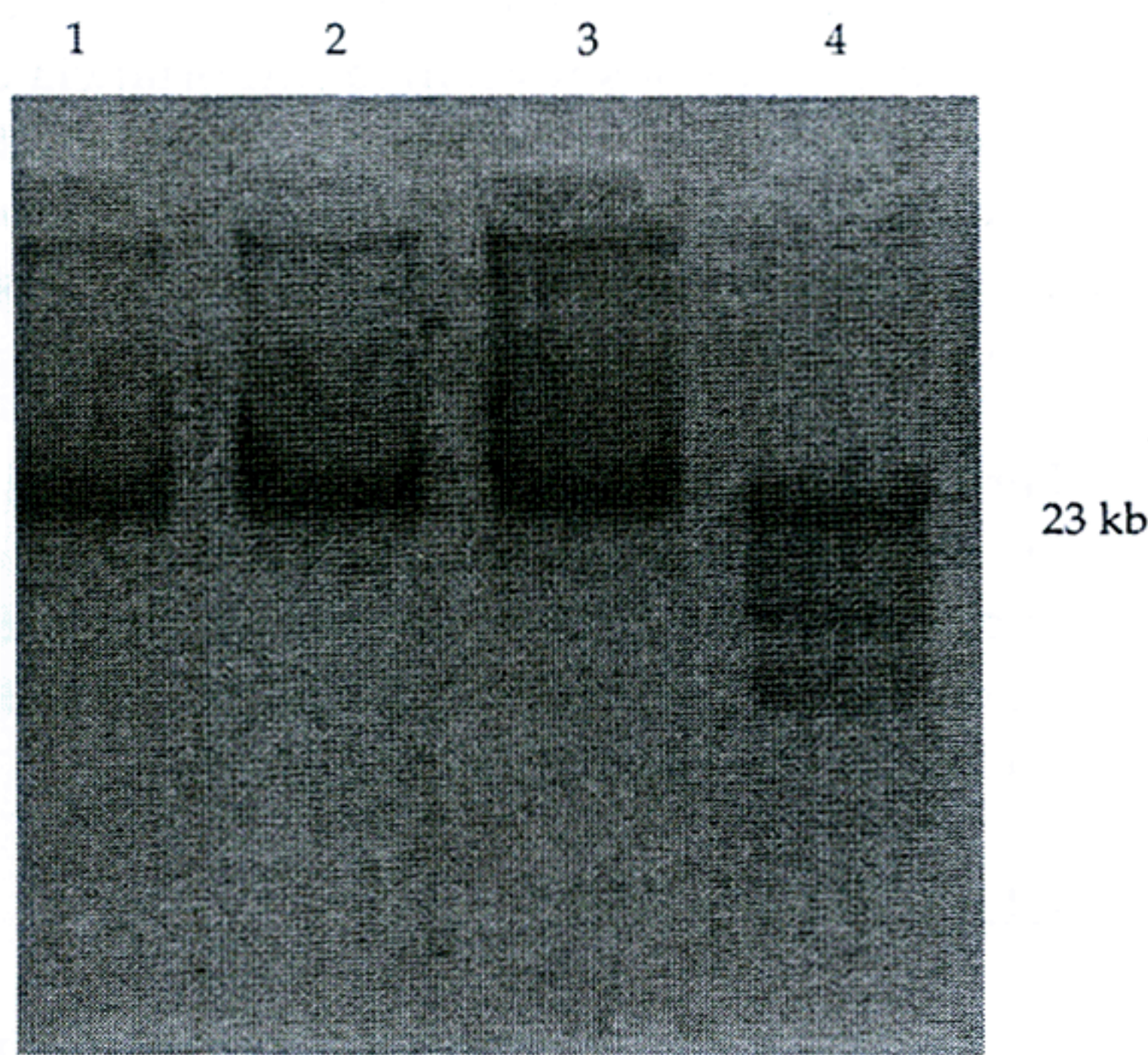


Figura 1. ADN total purificado de hisopados rectales de pollos.

Línea 1, muestra directa; 2 y 3, aislados; 4, ADN del fago λ /Hind III.

Detección de *C. jejuni* por PCR anidada. En el 96% (48/50) de los hisopados cloacales se identificó la

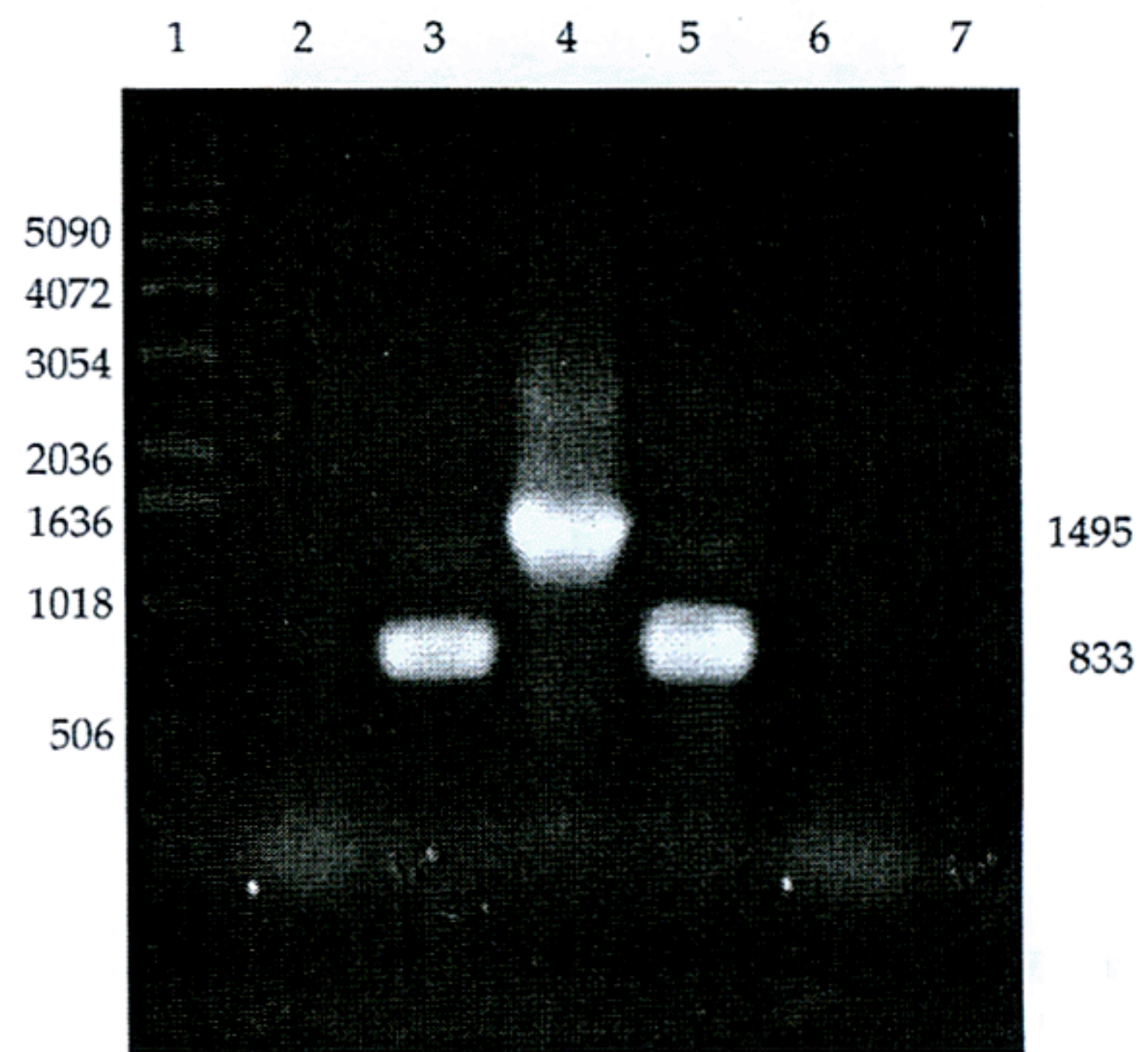


Figura 2. Producto amplificado del gen ribosómico 16S de *Campylobacter spp* por PCR anidada. Líneas 2, 4 y 6, primera reacción de PCR; Líneas 3, 5 y 7, segunda reacción de PCR. Línea 1, Ladder 1kb; Líneas 2 y 3, muestra directa; Líneas 4 y 5, cepa MP4; Líneas 6 y 7, control negativo.

Tabla 1. Cebadores, tamaño de los amplicones y condiciones de PCR utilizadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada para la detección de *Campylobacter jejuni* en pollos.

Gen	Cebador	Secuencia del cebador	Hibridación (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
Ribosómico 16S	CG12-F CG1507-R	5'TTGATCCTGGCTCAGAGT3' 5'TTCACCCCAGTCGCTGAT3'	60 (5, 10)	1495
Ribosómico 16S (Nested)	CcCJ609-F CcCj1442-R	5'ATCTAATGGCTTAACCATTA3' 5'GTAAGTATTAGTATTCCGG3'	55 (11)	833
hipO	Hip100-F Hip1128-R	5'ACTGCAAAATTAGTGGCG3' 5'GAGCTTTAGCAAACCTTCC3'	55 (5)	1028
hipO (Nested)	Hip100-F Hip483-R	5'ACTGCAAAATTAGTGGCG3' 5'CGTACCAAAGGCATAT3'	55 (5)	383

En la figura 3, se observan los productos de 1028 pb y de 383 pb que corresponden a la PCR y PCR anidada del gen *hipO* que confirman la presencia de *C. jejuni*. Las muestras positivas para los genes ribosómicos 16S e *hipO* confirmaron la presencia de *C. jejuni*. De las 50 muestras de hisopados se aislaron 29 cepas de *C. jejuni*, las cuales fueron confirmadas por la PCR anidada, lo que representa el 58%.

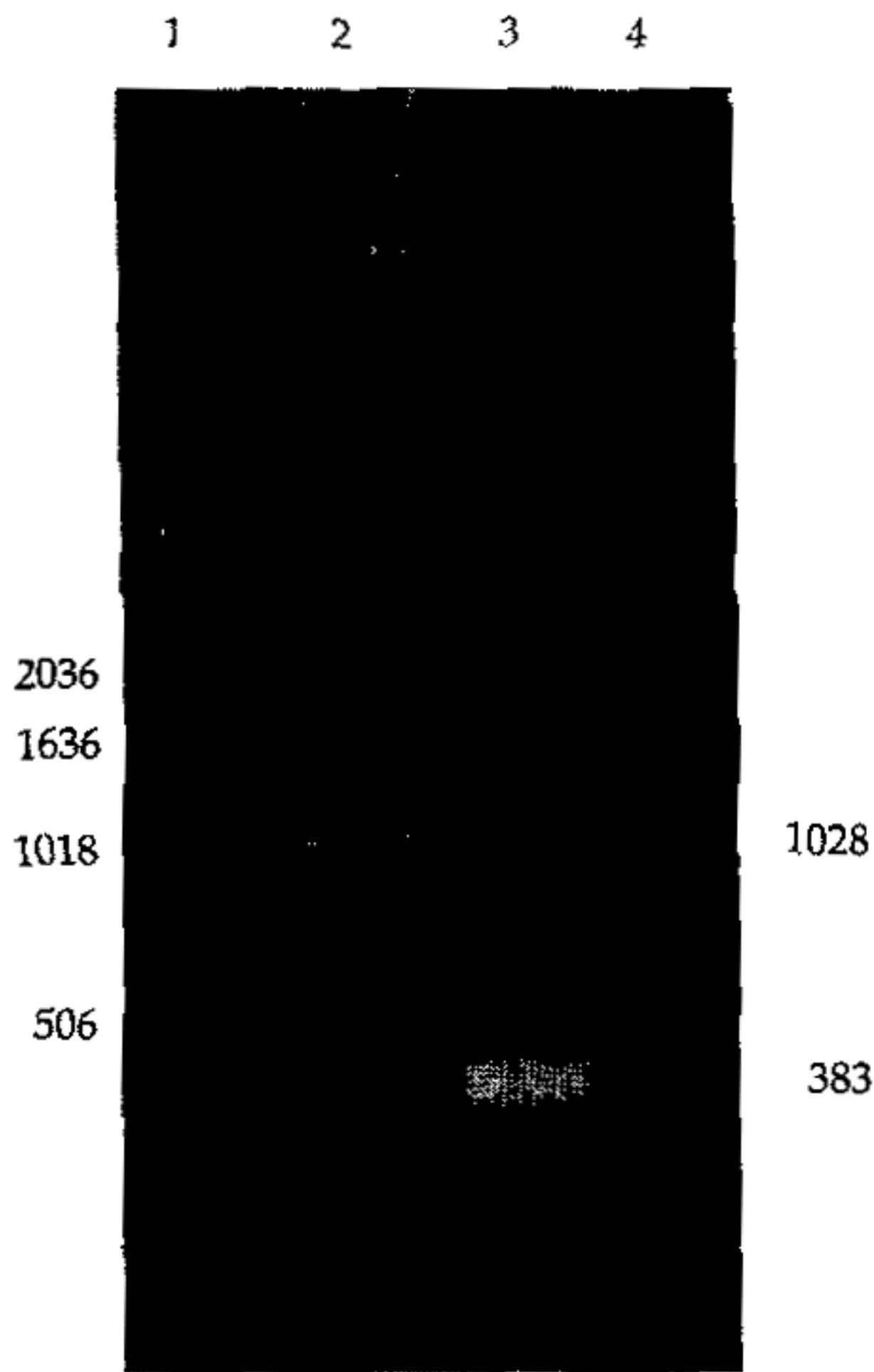


Figura 3. PCR anidada del gen *hipO* de *C. jejuni*. Líneas 2 y 3, Primera y segunda reacción; Línea 3, blanco; Línea 1, Hyperladder II.

DISCUSIÓN

Campylobacter jejuni es la primera causa de diarrea en países desarrollados y en vías de desarrollo llegando en algunos países industrializados a ser un problema de salud pública de más importancia que *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli*¹².

Desde la década del '90 y a pesar del aumento en las exigencias sanitarias en la industria de alimentos de Europa Occidental, Norteamérica, Australia y Nueva Zelanda, los casos de infecciones producidas por *Campylobacter* se han incrementado, destacando Dinamarca, donde los casos se triplicaron entre 1990 y 2000¹³.

Los cebadores CG12-F y CG1507-R permitieron amplificar los genes ribosómicos 16S para el género *Campylobacter*. En la PCR anidada se utilizó 1 µL

del producto amplificado y los oligonucleótidos CcCj609-F y CcCj1442-R los cuales amplificaron una secuencia interna específica de 833 pb para *C. jejuni* y *C. coli*, permitiendo diferenciarlas de otras especies del género *Campylobacter*^{5, 10, 11}. El gen *hipO* esta sólo en *C. jejuni*⁷ por lo que la PCR anidada basado en este gen sirvió para confirmar la presencia de esta bacteria y diferenciarla de *C. coli*.

La metodología empleada permitió detectar *Campylobacter jejuni* en el 98% (48/50) de las muestras directas, mientras que por cultivo microbiológico se aisló sólo en el 58% (29/50). La PCR anidada, como método rápido presentó mayor sensibilidad, debido a que detecta bacterias viables cultivables y no cultivables⁵. Varios estudios revelan la importancia de las formas viables no cultivables de *Campylobacter jejuni* en el proceso de transmisión de este enteropatógeno, las cuales recuperan su forma bacilar al ser inoculados en células animales^{14, 15}.

En el Perú, la información epidemiológica relacionada a *C. jejuni* en pollos es todavía incompleta y la PCR anidada en base a los genes ribosómicos 16S e *hipO* podría ser una técnica alternativa para su implementación en estudios a gran escala.

AGRADECIMIENTOS

Al Vicerrectorado de Investigación por el financiamiento parcial del trabajo de investigación mediante los proyectos 050401057. Además, a A. Horna por proporcionar la cepa *C. jejuni* subs *jejuni* ATCC 33560.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV. "Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized countries". In: Nachamkin I, Blaser MJ eds. *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington DC, 2000.121-138.
2. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. *Campylobacter species and Guillain-Barre syndrome*. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 555-567.
3. Corry JEL and Atabay HI. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. J Appl Microbiol. 2001; 90: 96-114.
4. Rowan NJ. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? Trends Food Sci Technol 2004; 15: 462-467.

5. **Bang DD, Pedersen K and Madsen M.** *Development of a PCR assay suitable for Campylobacter spp. mass screening programs in broiler production.* J Rapid Methods Aut Microbiol. 2001; 9: 97-113.
6. **Hani EK, Chan VL.** *Expression and characterization of Campylobacter jejuni benzoylglycine amidohydrolase (hippuricase) gene in Escherichia coli.* J. Bacteriol. 1995; 177: 2396-402.
7. **Slater ER, Owen RJ.** *Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of Campylobacter jejuni is highly conserved.* Lett Appl Microbiol 1997; 25: 274-8.
8. **Raulselin H, Jusufovic J, Hänninem MI.** *Identification of hipurase negative thermophilic campylobacters.* Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 35: 9-12.
9. **Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T.** *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* p. 2a ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1989.
10. **Linton D, Owen RJ, Stanley J.** *Rapid identification by PCR of the genus Campylobacter and of five species enteropathogenic for man and animals.* Res. Microbiol 1996; 147: 707-18.
11. **Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J.** *PCR detection, identification to species levels and fingerprinting of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli direct from diarrheic samples.* J Clin Microbiol 1997; 35: 2568-72.
12. **Bodhidatta L, Vithayasai N, Eimpokalarp B, Pitarangsi C, Serichantalergs O, Isenbarger DW.** *Bacterial enteric pathogens in children with acute dysentery in Thailand: increasing importance of quinolone-resistant Campylobacter.* Southeast Asian J Trop Med Public Health 2002; 33: 752-7.
13. **Anonymous.** *The increasing incidence of human campylobacteriosis. Report and proceedings of a WHO consultation of experts.* Copenhagen, Denmark, World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2000.
14. **Jones DM, Sutcliff EM, Curry A.** *Recovery of viable but non-culturable Campylobacter jejuni.* J Gen Microbiol 1991; 137:2477-82.
15. **Stern NJ, Jones DM, Wesley IV, Rollins DM.** *Colonization of chicks by non-culturable Campylobacter spp.* Lett Appl Microbiol 1994; 18: 333-6