

## Genotipos de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* aislados de fetos porcinos abortados.

Giacoboni G.<sup>1</sup>, Perfumo C.<sup>2</sup>, Echeverría M.<sup>3</sup>

1. Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas. Calle 60 y 118 CC296 (B1900AVW) La Plata, Argentina. E-mail: giacoboni@fcv.unlp.edu.ar  
2. Cátedra de Patología Especial.

3. Cátedra de Virología. CONICET - Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de La Plata. Argentina

**Palabras clave:** *Campylobacter jejuni/coli*, aborto, cerdos, genotipos.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni/coli*, abortion, pig, genotypes.

### RESUMEN

Se estudiaron 11 cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de fetos porcinos identificadas y biotipificadas por pruebas bioquímicas: 8 como *Campylobacter jejuni* biotipo II (*C. jejuni*), 2 *C. jejuni* biotipo I y 1 *Campylobacter coli* (*C. coli*). Las cepas aisladas se diferenciaron por 2 técnicas de biología molecular: corte con enzimas de restricción del ADN genómico total (REA) utilizando las enzimas HaeIII y HindIII y corte del PCR gen *fla-A* utilizando la enzima DdeI. El REA mostró siete patrones de restricción diferentes en las 11 cepas estudiadas y se pudieron observar mínimas diferencias entre *C. jejuni* y *C. coli*. Con PCR-RFLP se pudieron diferenciar 6 patrones dentro de la especie *C. jejuni* biotipo II de Lior y no se pudo distinguir entre ambas especies. PCR-RFLP resultó ser una herramienta adecuada para diferenciar entre las cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de algunos establecimientos.

### SUMMARY

**Genotypical diversity of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* isolated from aborted pig fetuses.**

Eleven *Campylobacter* strains isolated from three different farms were studied. Eight strains were identified as *Campylobacter jejuni* biotype II of Lior, 2 as *C. jejuni* biotype I and 1 as *C. coli* biotype I. Two molecular methods were applied in order to differentiate these strains: genomic DNA restriction enzyme analysis (REA) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) of PCR *fla-A* gene. Seven different patterns were shown for the 11 strains studied by means of REA and minimal differences between *C. coli* and *C. jejuni* were observed. By means of PCR-RFLP 6 restriction patterns were found among Lior's *C. jejuni* biotype II strains. Digestion of the PCR *fla-A* gene with DdeI enzyme could not discriminate between *C. jejuni* and *C. coli*. However, the PCR-RFLP method provides a suitable tool for epidemiological purposes to differentiate *Campylobacter* strains, even among strains isolated from same farms.

### Introducción

*Campylobacter jejuni* es uno de los agentes etiológicos que causan diarrea en el hombre y que se encuentran como comensales en pollos, cerdos, ovejas, vacas, perros, gatos y aves silvestres (Blaser, Taylor, Feldman, 1983). Como causa de aborto se lo asocia a mujeres embarazadas que han tenido enteritis (Sarah, McDonald, Gruslin, 2001) y en ovejas durante el último período de preñez. Aunque los cerdos pueden albergar en el tracto intestinal diversas especies de *Campylobacter*, el aborto se lo atribuye al género *Arcobacter* de la Familia *Campylobacteraceae*. En el Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones de la FCV-UNLP se aislaron *C. jejuni* y *C. coli* de fetos abortados y se consideró que estos aislamientos podrían haber sido los agentes etiológicos de los mencionados abortos porcinos (Giacoboni, Echeverría, Perfumo, 2002 a y b). Las especies de *Campylobacter* son difíciles de diferenciar por pruebas bioquímicas y hay escasos métodos estandarizados para su caracte-

rización. Para su estudio se pueden aplicar métodos fenotípicos y perfiles proteicos y moleculares, aunque aún no se ha establecido una técnica de biología molecular de referencia. En este trabajo se estudiaron 11 cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de un total de 75 muestras procesadas de fetos porcinos provenientes de 8 granjas diferentes. Las mismas fueron identificadas y biotipificadas por pruebas bioquímicas (Lior, 1984). Para comparar las diferencias entre las mismas se empleó el corte con enzimas de restricción del ADN genómico total (REA) y del gen *fla-A* obtenido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP).

### Materiales y métodos

**Origen de las cepas:** Se utilizaron 10 cepas de *Campylobacter* caracterizándose 8 como *C. jejuni* biotipo II de Lior, 2 como *C. jejuni* biotipo I y 1 como *C. coli*. (Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, FCV-UNLP) y la cepa control de referencia ATCC 29488.

**Extracción de ADN:** Las cepas de *Campylobacter* se sembraron en placas de agar sangre incubadas en condiciones microaerófilas a 42°C. A las 48 horas se tomó una ansada del crecimiento, se lavó en 1ml de CINA 0,9% y se centrifugó 5 minutos a 1.000 g. El paquete celular se resuspendió en 540µl de buffer Tris-EDTA (TE) 0,001M pH 8, con el agregado de 50µl de lisozima (10mg/ml) y 60µl de SDS (10%) y se lo incubó a 37°C por 15 minutos. Luego se le agregó 3µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se lo incubó toda la noche a 37°C. Se centrifugó a 20.000 g y 700µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo Eppendorf agregándole 700µl de TE fenol-saturado. El ADN se extrajo con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto (1200µl) y 60µl de acetato de sodio 3M. Después de la centrifugación el ADN fue lavado con etanol 70° desecado y resuspendido en 100µl de TE. Finalmente, el ADN fue tratado con 3µl de RNasa (5µg/ml) por 45 minutos a 37°C.

**Corte con enzimas de restricción del ADN genómico:** Aproximadamente unos 5µg de ADN purificado fueron digeridos con 20U de HaeIII y HindIII en un volumen final de 20µl e incubados a 37°C durante toda la noche. Después fueron corridos 20µl en gel de agarosa al 0,7% (140 x 150 x 5 mm) en solución de Tris-acetato – TAE- (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 20V durante 16 horas se tiñeron con bromuro de etidio (1µg/ml) y se visualizaron con luz UV.

**Corte con enzimas de restricción del gen fla-A:** Para obtener la secuencia nucleotídica del gen fla-A se utilizó el protocolo de Nachamkin (2001). El ADN se utilizó en una concentración final de 20 ng/µl. Para amplificar el gen fla-A, un amplicón de 1700 bp se utilizó un par de cebadores con la siguiente secuencia: Cebador 1: 5' GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT CGT GC 3', cebador 2: 5' CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG 3'. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 100µl conteniendo 8µl de ADN diluido y los siguientes reactivos: buffer PCR (1X), MgCl2 (1,5mM), cebadores (1µM de cada uno), mezcla de dNTPs (200µM de cada uno) y 2.5 U de Taq polimerasa. La mezcla se procesó utilizando un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. La desnaturación se efectuó a 94°C durante 1

min. Luego se realizaron 45 ciclos, constando cada uno de las siguientes etapas: 94°C 59 segundos, hibridación a 52°C 59 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto y 45 segundos. Después de los 45 ciclos las muestras se mantuvieron a 72°C durante 5 minutos. Posteriormente, 5µl de cada una de las muestras se corrieron en gel de agarosa al 0,7% en buffer TAE y se tiñeron con bromuro de etidio. Para examinar los productos de PCR con la enzima de restricción Ddel, los mismos fueron precipitados agregando 2 volúmenes de etanol absoluto, se lavaron con etanol 70° y se resuspendieron en 20 µl de buffer TE. Estos productos así purificados se digirieron con 10U de la enzima Ddel durante toda la noche a 37°C. Posteriormente se corrieron en gel de agarosa Scakem al 2% a 90V durante 4 horas utilizando como marcador de 100bp el Molecular Ruler 170-8002 Bio Rad que se sembró cada 4 calles del gel.

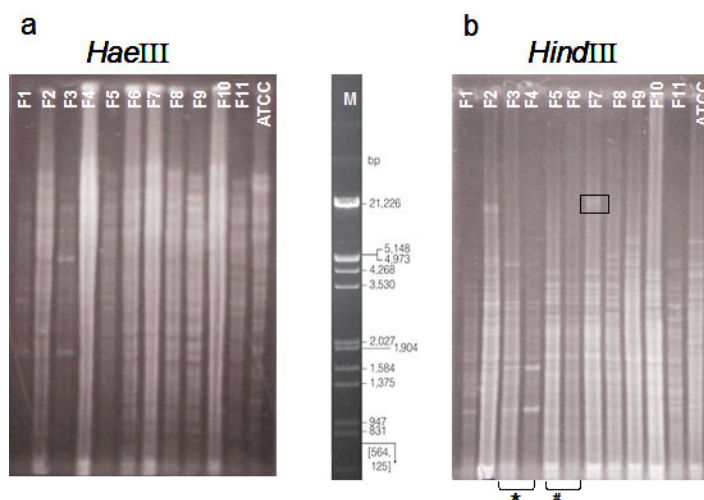
**Análisis de los productos con la enzima de restricción Ddel:** El análisis de las bandas obtenidas mediante el corte con la enzima de restricción Ddel fue realizado con el programa Bionumerics versión 3.0 (Applied Maths BVBA, Belgium). La posición de cada una de las bandas se asignó manualmente y el análisis del agrupamiento se realizó según el coeficiente de Dice y método UPGMA. Las imágenes fueron capta-

das empleando un transiluminador de luz UV, se fotografiaron con una cámara Kodak Digital Science® y se analizaron con el Software Análisis ID Image.

## Resultados

**Digestión del ADN genómico:** Ambas enzimas, HaeIII y HindIII, cortaron el ADN de las cepas estudiadas y se obtuvieron fragmentos de más de 10 kb (fotografía 1 a y b). De las 11 cepas procesadas se pudieron identificar 9 patrones diferentes con HindIII y ninguna de las cepas mostró un patrón similar a la cepa de referencia ATCC 29488. Las cepas F1, F2, F5, F6, F8 y F9 se aislaron de la misma granja y pertenecieron al biotipo II de Lior pero mostraron diferentes patrones de restricción (cuadro 1) y de éstas, sólo F5 y F6 tuvieron patrones de ADN idénticos (patrón 4). Los aislamientos F3 y F4, pertenecientes a la misma granja fueron identificados por pruebas bioquímicas como *C. jejuni* biotipo I de Lior y fueron similares en su patrón de corte (patrón 3). La cepa F7 (*C. coli*) mostró patrón 4, idéntico a F5 y F6 en bandas menores a 10 kb, pero con la particularidad de una doble banda de 22 kb. Las cepas F10 y F11 exhibieron diferentes patrones (7 y 8) a pesar de haber sido aisladas de la misma granja y presentar el mismo fenotipo (*C. jejuni* II).

Fotografía 1 (a y b)



Patrones de restricción obtenidos con las enzimas HaeIII (a) y HindIII (b) del ADN genómico de las 11 cepas aisladas (F1 a F11) de *Campylobacter* y la cepa patrón ATCC29488. M: Marcador de pares de bases. (\*) y (#) indican idénticos perfiles entre sí (F3 con F4) (F5 con F6) respectivamente.

Cuadro 1.

CEPAS	GRANJA	ESPECIES Y BIOTIPOS DE LIOR	Patrones ADN	SUBTIPOS PCR/RFLP
F1	A	<i>C. jejuni</i> II	1	A
F2	A	<i>C. jejuni</i> II	2	B
F3	B	<i>C. jejuni</i> I	3	C
F4	B	<i>C. jejuni</i> I	3	C
F5	A	<i>C. jejuni</i> II	4	D
F6	A	<i>C. jejuni</i> II	4	D
F7	A	<i>C. coli</i>	*	D
F8	A	<i>C. jejuni</i> II	5	E
F9	A	<i>C. jejuni</i> II	6	D
F10	C	<i>C. jejuni</i> II	7	F
F11	C	<i>C. jejuni</i> II	8	G

Se indica la procedencia de cada una de las cepas, sus especies y biotipos de Lior, sus patrones de ADN genómico de acuerdo al corte con HindIII y sus subtipos obtenidos luego de la digestión con Ddel de los productos de PCR del gen fla-A de las 11 cepas de *Campylobacter* aisladas. (\*) Indica patrón idéntico a F5 y F6 (patrón 4) en bandas menores a 10 kb, con presencia de doble banda de 22 kb.

**PCR-RFLP:** A partir de las 11 cepas procesadas (F1 a F11) se obtuvieron productos de PCR de 1700 bp. La digestión con la enzima Ddel generó entre 3 a 7 bandas comprendidas entre 100 y 1200 bp y se pudieron diferenciar 7 subtipos (A-G). El

método de agrupación UPGMA empleó el coeficiente de Dice y los patrones se definieron con 1% de optimización y 1% de tolerancia. Los datos se compararon con un rango de tamaño de 100-500 bp y una masa de ADN de 50ng. El

dendrograma de la Figura 1 muestra la relación entre los diferentes patrones de las 11 cepas estudiadas. El máximo agrupamiento (100%) se obtuvo entre F3 y F4 y entre F5, F6, F7 y F9.

Figura 1

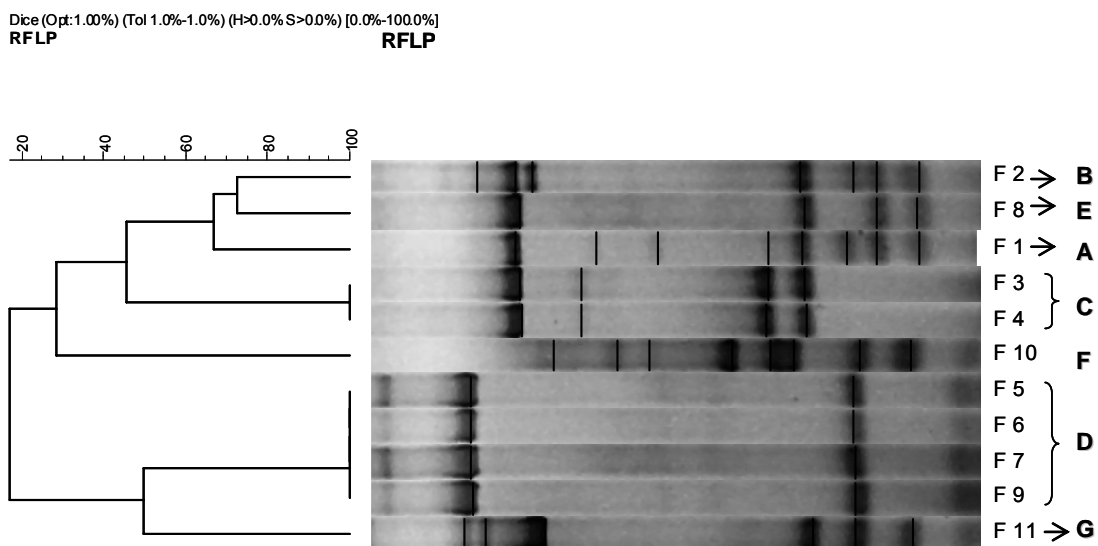


Figura 1: Dendrograma de la relación genética entre 7 patrones de PCR-RFLP-del gen fla-A de cepas de *Campylobacter jejuni* biotipo I y II de Lior, y *C. coli* (F7). A la izquierda se muestra el agrupamiento de las distintas cepas aisladas y a la derecha los subtipos. El máximo agrupamiento: 100% entre F3 y F4 y 100% entre F5, F6, F7 y F9. Dice (Opt:1.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

## Discusión

La digestión del ADN genómico con las enzimas HaeIII y HindIII de las cepas en estudio mostró modelos de bandas múltiples. Con la enzima HindIII se logró una mejor discriminación entre las cepas aisladas, obteniéndose bandas de más de 2 kb (Giacoboni, Echeverría, Perfumo, 2002 a y b). A partir de las 11 cepas analizadas se obtuvieron 9 patrones de ADN diferentes. Owen, Fernández y Bolton (1990) observaron resultados similares y concluyeron que el uso de estas endonucleasas es complejo para exponer el análisis detallado de los mismos. La inspección de los geles reveló mínimas diferencias entre *C. jejuni* y *C. coli* para el análisis del ADN genómico. Esta discriminación entre ambas especies también fue hallada por otros investigadores cuando utilizaron las enzimas de restricción HaeIII y ClaI (Korolik, Moorthy y Coloe, 1995; Smith, Olukova, Fox y Coker, 2000). Sobre el total de las cepas identificadas bioquímicamente como *C. jejuni* biotipo II de Lior se pudieron diferenciar 7 patrones diferentes independientemente del lugar de origen. Al realizar la reacción de PCR, si bien la misma se efectuó acorde con el protocolo de Nachamkin (2001), en primera instancia no se obtuvieron resultados. Debido a esto se modificaron las temperaturas de hibridación, elevándose de 44°C a 54,5°C mediante el termociclador de gradiente Perkim

Elmer. Se determinó que la temperatura óptima en la cual se encontraron resultados positivos fue 52°C. Estos resultados se diferenciaron de los que obtuvieron Harrington, Thomson y Carter (1976), quienes al reducir la temperatura de 55°C a 45°C incrementaron la resolución entre las bandas. El corte del gen fla-A con la enzima Ddel mostró mejores diferencias entre las cepas identificadas fenotípicamente como *C. jejuni*. A partir de 8 cepas (F1, F2, F5, F6, F7, F8, F9, F10) de *C. jejuni* biotipo II de Lior se obtuvieron 6 subtipos distintos. Las diferencias están indicadas entre paréntesis en la Figura 1 cerca del brazo del dendrograma respectivo. El porcentaje de similitud fue de 66,7% entre los grupos 2 y 5, sin embargo no se pudo diferenciar a *C. coli*.

La variabilidad entre las especies de *Campylobacter* también la observaron varios autores usando diferentes métodos de biología molecular. Weijtens, Reinders, Urlings, Van der Plas (1999) mostraron más de una diferencia utilizando el método de ERIC-PCR proveniente de campilobacterias de la misma muestra de materia fecal y utilizando otras enzimas de restricción como BgeIII, ClaI, PstI y PvuII. Moore, Lanser, Heuzenroeder, Ratcliff, Millar y Madden (2002) demostraron diferencias entre cepas de *C. jejuni* y *C. coli* aisladas de frigoríficos utilizando la técnica de PCR-RFLP con el gen fla-A. En su trabajo, amplificaron una sola región del gen fla-A (región

variable SVR) que fue cortada con las enzimas PstI y HaeIII. El resultado fue una amplia variabilidad en los genotipos hallados. Se demostró que la variabilidad del gen fla-A está localizada en 2 regiones (Meinermann, Helsel, Fields y Hiett, 1997), una de ellas es la SVR (450-600bp) que tiene el mismo grado de discriminación que se observa al analizar toda la secuencia del amplicón fla-A. En este estudio nosotros obtuvimos diferencias genéticas entre las cepas aisladas e identificadas fenotípicamente como *C. jejuni* provenientes de fetos abortados de la misma granja así como de granjas diferentes. De este modo pudimos diferenciar genotípicamente las mismas. La evaluación interlaboratorial de PCR-RFLP realizada por Harrington, Moran, Ridley, Newell y Madden (2003) con el gen de la flagelina concluyó que es necesario estandarizar este procedimiento (cebadores, enzimas de restricción, etc.) para poder reproducirlo en todos los laboratorios, aunque dichos autores afirmaron que la técnica tiene buena discriminación intraespecie similar a la obtenida por electroforesis de campo pulsado (PFGE), AFLP y RAPD. Aunque hay una gran variedad de técnicas disponibles para aplicar en el estudio epidemiológico de *Campylobacter*, la técnica de PCR-RFLP para el gen de la flagelina utilizando la enzima de restricción Ddel, demostró ser simple y accesible para diferenciar las especies fenotípicamente idénticas.

**Agradecimientos:** A la Dra. Viviana Ritacco y Dr. Gerardo Leotta, Instituto de Salud Dr. Carlos Malbrán y al Lic. Germán Metz, Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP.

## Bibliografía

1. **Blaser, M.J.; Taylor, D.N; Feldman, R.A. 1983.** Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. Epidemiol. Rev. 5:157-176.
2. **Giacoboni, G.; Echeverría, M.G.; Perfumo, C.** Utilización de enzimas de restricción para la identificación de especies de *Campylobacter* aislados de abortos suinos. XIV Reunión Científico Técnica. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Villa General Belgrano, Córdoba. 13-15 de noviembre de 2002<sup>a</sup>.
3. **Giacoboni, G.; Echeverría M.G.; Perfumo, C. 2002b.** *Campylobacter jejuni* y *C. coli* en suinos abortados: comparación entre la identificación fenotípica y los perfiles proteicos en geles de poliacrilamida. Rev. Arg. Microbiol. 34: 199-204.
4. **Harrington, C.S.; Thomson-Carter, F. M.; Carter, P. E. 1976.** Evidence for recombination in flagellin locus of *Campylobacter jejuni*; implications for the flagellin gene typing scheme. J. Clin. Microbiol. 35: 2836-2892.
5. **Harrington, C.S.; Moran, L.; Ridley, A.M.; Newell, D.G.; Madden, R.H. 2003.** Inter-laboratory evaluation of three flagellin PCR/RFLP methods for typing *Campylobacter jejuni* and *C. coli*: the CAMPYNET experience. J. Appl. Microbiol. 95: 1321-1333.
6. **Korolik, V.; Moorthy, L.; Coloe, P. 1995.** Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains by using restriction endonuclease DNA profiles and DNA fragment polymorphisms. J. Clinical Microbiol 33: 1136-1140.

7. **Lior, H. 1984.** New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lariidis*. J. Clin. Microbiol. 20: 636-640.
8. **Meinesmann, R.J.; Hesel, L.O.; Fields, P.I.; Hielt, K.L. 1997.** Discrimination of *Campylobacter jejuni* isolated by fla gene sequencing. J. Clin. Microbiol. 35: 2810-2814.
9. **Moore, J.E.; Lanser, J.; Heuzenroeder, M.; Ratcliff R.M.; Millar, B.C.; Madden, R.H. 2002.** Molecular diversity of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* isolated from pigs.at slaughter by flaA-RFLP analysis and ribotyping. J Vet B Infect Dis Vet Public Health 49: 388-393.
10. **Nachamkin I. 2001.** flaA typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*: Protocols and notes on protocols CAMPYNET subgroup 3. CAMPYNET Website. <http://www.svs.dk/campynet/>
11. **Owen, R.J.; Fernández, J.; F. Bolton. 1990.** DNA restriction digest and ribosomal RNA gene patterns of *Campylobacter jejuni*: a comparison with bio-, sero-, and Bacteriophage types of United Kingdom outbreak strains. Epidemiol. Infect. 105: 265-275.
12. **Sarah D.; Mcdonald, Ba; Md, And Andrée Gruslin, Md, Fracs. 2001.** A review of *Campylobacter* infection during pregnancy: a focus on *C. jejuni*. Elsevier 2001. 8: 253- 257
13. **Smith Si; Olukoya Dk; Fox Aj; Coker Ao. 2000.** Deoxyribonucleic acid restriction digest patterns in *Campylobacter* species: a comparison with Penner serotype. British J of Biomedical Science, 57:137-141.
14. **Weijtens, M.J., Reinders, R.D., Urlings, H. A., Van Der Plas, J. 1999.** *Campylobacter* infections in fattening pigs: excretion pattern and genetic diversity. J. Appl. Microbiol. 86: 63-70.