

Aplicación de PCR-RFLP para subtipificar *Campylobacter jejuni*

G. GIACOBONI^{1*}, M.G. ECHEVERRÍA², C. PERFUMO³

¹Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 60 y 118 CC296 (B11900AVW) La Plata, Argentina.

²Cátedra de Virología CONICET; ³Cátedra de Patología Especial.

*Correspondencia. E-mail: giacoboni@fcv.unlp.edu.ar

RESUMEN

Diez cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de fetos porcinos abortados fueron identificadas por pruebas bioquímicas: 8 como *C. jejuni* biotipo II de Lior, y 2 como *C. jejuni* biotipo I. Para poder subtipificarlas se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen *flaA* y al producto obtenido se lo digirió con la enzima de restricción *Ddel* (RFLP). Se pudieron obtener 6 subtipos a partir de *C. jejuni* biotipo II, mientras que los dos aislamientos de biotipo I correspondieron a un mismo subtipo. Aunque existe una amplia variedad de técnicas de biología molecular que son aplicadas con fines epidemiológicos para *Campylobacter*, PCR-RFLP, demostró ser una técnica simple y accesible, capaz de subtipificar a *C. jejuni*.

Palabras clave: *Campylobacter jejuni*, subtipificación, PCR-RFLP

SUMMARY

PCR-RFLP for *Campylobacter jejuni* subtyping. Ten *Campylobacter jejuni* isolates, 8 identified as *C. jejuni* biotype II of Lior and 2 as *C. jejuni* biotype I, were recovered from aborted pig fetuses. In order to discriminate among strains, restriction fragment length polymorphism (RFLP) using *Ddel* of polymerase chain reaction (PCR) products of *flaA* gene was used. *C. jejuni* biotype II strains could be differentiated in 6 by PCR-RFLP, and one subtype was obtained from *C. jejuni* biotype I. Although there is great variability of molecular techniques applied to the *Campylobacter* epidemiological studies, PCR-RFLP demonstrated to be a simple and accessible technique to discriminate *Campylobacter jejuni* isolates.

Key words: *Campylobacter jejuni*, subtypes, PCR-RFLP

Desde que Vandamme en 1991 propuso a la familia *Campylobacteraceae* como superfamilia VI de acuerdo con los estudios de rRNA, una amplia variedad de subespecies se definieron tanto en el género *Campylobacter* como en el género *Arcobacter* (12). Las especies *C. jejuni* y *C. coli* son una de las causas de enteritis aguda en humanos, siendo los animales domésticos y silvestres, en particular las aves, los reservorios de *C. jejuni*, y los cerdos de *C. coli* (1). Los alimentos de origen animal (carne de aves, cerdo) hacen de esta zoonosis una enfermedad transmitida por alimentos (ETA), entre otras maneras de transmitirse al humano.

Estas bacterias tienen escasa actividad bioquímica. Al no fermentar los hidratos de carbono, se utilizan pruebas de tolerancia a diferentes temperaturas, la prueba de la hidrólisis del hipurato e hidrólisis del indoxil acetato, la sensibilidad a discos de 30 µg de ácido nalidíxico y cefalotina, y según la especie a identificar la tolerancia a diferentes concentraciones de sustancias como NaCl, glicina, etc. Son pocos los métodos fenotípicos (serotipificación, biotipificación, tipificación por fagos) que discriminen satisfactoriamente una especie o subespecie.

Este inconveniente se exagera porque todos ellos revelan una enorme diversidad (10).

Actualmente, la biología molecular aporta una amplia variedad de técnicas para subtipificar genotípicamente a *Campylobacter spp.* Algunas de ellas se basan en la digestión por enzimas de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) (4), en la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) (7), ribotipificación (3) o la electroforesis en geles de agarosa con campo pulsado (PFGE) (2, 8).

Dentro de la gran oferta de posibilidades de las técnicas de biología molecular, la elección depende del objetivo del trabajo y las posibilidades de poder acceder a ellas, pues requieren un equipamiento especial y altos costos en los elementos que se utilizan para realizarlas. A lo anterior habría que sumarle que no hay una prueba de oro incuestionable que se utilice como referencia, por lo que las variaciones en los resultados que se obtienen por las diferentes pruebas aplicadas dificultan su interpretación (13).

La técnica de PCR-RFLP para el gen *flaA* se basa en la amplificación del gen de la flagelina por PCR, seguida

por la digestión por enzimas de restricción que generen fragmentos. La diferencia en la distribución de los sitios de restricción en los genes *fla* entre las cepas generará fragmentos de diferente tamaño y por lo tanto un modelo de banda diferente, que se visualizará cuando se los separe por electroforesis (4).

El objetivo de este trabajo fue aplicar una técnica de biología molecular accesible, con la que pudiéramos subtipificar las especies de *Campylobacter jejuni* de origen porcino obtenidas de diferentes establecimientos (cuatro), e identificadas previamente por pruebas bioquímicas.

A 10 cepas aisladas de abortos porcinos e identificadas bioquímicamente como *C. jejuni* I de Lior (dos cepas, denominadas F3 y F4), *C. jejuni* II de Lior (ocho cepas denominadas F1, F2, F5, F6, F8, F9, F10 y F11) (6) se les extrajo el ADN por el método de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (5) y la cuantificación se realizó en espectrofotómetro. El ADN obtenido se diluyó con agua destilada estéril hasta obtener una concentración final de 20 ng/μl. Para la reacción en cadena de la polimerasa se utilizaron los cebadores para amplificar el gen *flaA*, obteniéndose un amplicon de 1700 bp. La secuencia de nucleótidos de los cebadores fueron: 1: 5'-GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT CGT GC y 2: 5'-CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTC. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 μl conteniendo 8 μl del ADN diluido. Los reactivos utilizados y la concentración final de la mezcla para PCR fueron: 1,5 mM MgCl₂, 1 μM de cada uno de los cebadores, 200 μM mezcla de cada uno de los dNTPs y 2,5 U de *Taq* polimerasa. Las condiciones de ciclado (Eppendorf Mastercycler Gradient) fueron: 94 °C 1 min, y luego 45 ciclos de 94 °C por 59 seg para la desnaturalización, para el alineamiento 52 °C por 50 seg y para la extensión a 72 °C durante 1 min 45 seg. Con un último ciclo de 5 min a 72 °C. Cinco microlitros del producto se sembraron en un gel de agarosa de 0,7%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó bajo transiluminador.

Cada uno de los productos obtenidos por PCR se precipitó con 2 volúmenes de etanol frío 99%, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 80 μl de buffer Tris-EDTA. Veinte μl del producto purificado se digirieron con la enzima *DdeI* a 37 °C 24 horas y posteriormente se sembraron en gel de agarosa al 2%, el cual fue sometido a electroforesis por 4 horas a 90V. Se utilizó además un producto de PCR digerido con *DdeI* de un aislamiento de *C. coli* (denominado F7) obtenido también de abortos porcinos y biotipificado previamente como *C. coli* biotipo I de Lior y una cepa de *C. jejuni* ATCC 29.488.

La reacción de PCR generó productos de 1700 bp de las 10 cepas procesadas (Figura 1). La digestión con la enzima *DdeI* mostró bandas de 100 a 1200 bp, diferenciándose distintos subtipos denominados A, B, C, D, E, F, G y H. Al subtipo A pertenece la cepa F1 (*C. jejuni* biotipo II de Lior); al subtipo B la cepa F2 (*C. jejuni* biotipo

II de Lior); al subtipo C, F3 y F4 (*C. jejuni* biotipo I de Lior); al grupo D las cepas F5, F6 y F9 (*C. jejuni* biotipo II de Lior) y F7 (*C. coli*); al subtipo E, la F8 (*C. jejuni* biotipo II de Lior); la cepa F10 (*C. jejuni* biotipo II de Lior) al grupo F y la cepa F11 (*C. jejuni* biotipo II de Lior) al grupo G. La cepa de *C. coli* (F7) aislada de abortos porcinos del mismo muestreo, no pudo diferenciarse del resto de las cepas tipificadas como *C. jejuni* F5, F6 y F9 en el

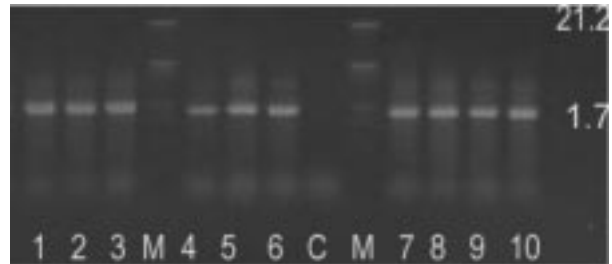


Figura 1. PCR del gen *flaA* de 10 cepas de *Campylobacter jejuni* aisladas de abortos porcinos. M: marcador de pares de bases (ADN fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII*); C: control blanco (agua).

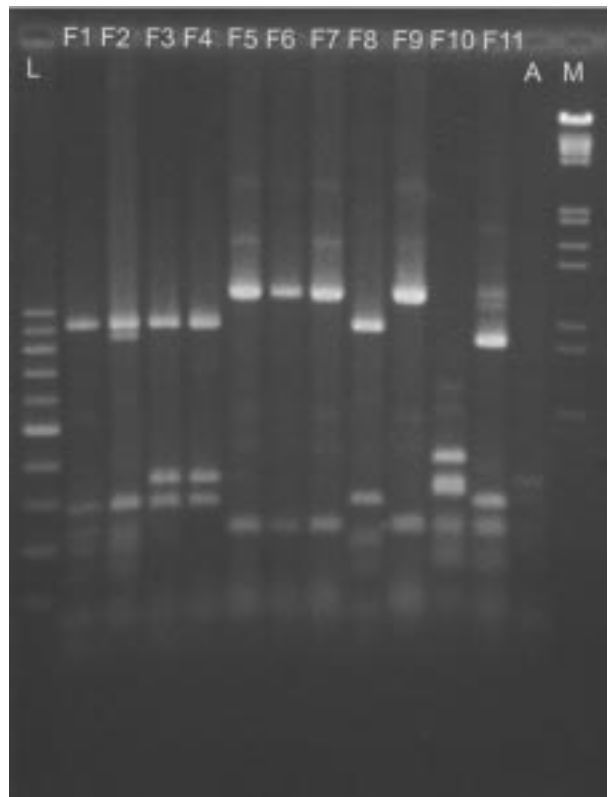


Figura 2. PCR-RFLP de las cepas de *Campylobacter* aisladas de abortos porcinos. L: ladder 100 bp; M: marcador de pares de bases ADN fago lambda digerido con *EcoRI* y *HindIII*; A: cepa control *C. jejuni* ATCC 29488.

número de bandas obtenidas, incluyéndola en el grupo D. La cepa de control *C. jejuni* ATCC 29488 fue incluida en el grupo H (Figura 2).

Con la técnica de PCR-RFLP utilizando la enzima *Ddel*, se pudo diferenciar dentro de las especies identificadas como *C. jejuni* con el esquema de biotipificación de Lior, única herramienta utilizada en nuestro país como técnica para discriminar entre las especies de valor epidemiológico. La variabilidad genética del género *Campylobacter* ya ha sido descrita por otros autores, especialmente las cepas de origen porcino, utilizando PCR-RFLP digerido con otras enzimas (9) u otras técnicas como consenso intergénico repetitivo de enterobacteraceae (ERIC-PCR) (14) y ribotipificación (9).

La electroforesis de campo pulsado es la técnica de elección para estudios epidemiológicos en varias especies bacterianas. Sin embargo, los valores discriminatorios generados por ella, AFLP y RAPD son similares a los obtenidos por la evaluación del gen *flaA* por PCR-RFLP (4). La electroforesis por campo pulsado tiene el inconveniente de ser una técnica que está lejos de ser aplicada en laboratorios que no tienen acceso a equipamientos costosos. En especial, las bacterias de la familia *Campylobacteraceae* que no se buscan de rutina precisamente por requerir microaerofilia y convertirse éste en un factor limitante para su aislamiento. La subtipificación con PCR-RFLP con *Ddel*, podría ser una técnica útil en los comienzos de la diferenciación molecular de *Campylobacter* en nuestro país. Sin embargo, en nuestro estudio no pudimos diferenciar una cepa de *C. coli* aislada del mismo muestreo ni tampoco fue posible encontrar un patrón parecido al obtenido con la cepa de referencia *C. jejuni* ATCC 29.488. Esta técnica, como tantas otras aplicadas a *Campylobacter* están en vías de ser estandarizadas (4).

En este estudio, el poder de discriminación de la técnica fue aceptable y corroboró como lo hicieron otros autores (4, 11) que en la especie porcina pueden coexistir una gran variedad genotípica de *Campylobacter* (9).

Este trabajo fue presentado en el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología y X Congreso Argentino

de Microbiología, realizado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires del 17 al 21 de octubre de 2004.

BIBLIOGRAFÍA

1. Blaser M, Berkowitz B (1979) *Campylobacter* enteritis: clinical and epidemiological features. *Am. Inter. Med.* 91: 179-185.
2. Champion C, Best E, Frost J (2002) Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2263-2265.
3. Fitzgerald C, Owen RJ, Stanley J (1996) Comprehensive ribotyping scheme for heat stable serotypes of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 265-269.
4. Harrington C, Moran L, Ridley A, Newell D, Madden R (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.
5. Lind L, Sjogren E, Melby K, Kaijser B (1996) DNA fingerprint and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from epidemic outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 43: 892-896.
6. Lior H (1984) New extended biotyping scheme for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lariidis*. *J. Clin. Microbiol.* 20: 636-640.
7. Madden R, Moran L, Scates P (1996) Sub-typing of animal and human *Campylobacter* spp. using RAPD. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 167-170.
8. Meinersmann R, Patton C, Evins G, Wachsmuth I, Fields P (2002) Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1789-1797.
9. Moore J, Lanser J, Heuzenroeder M, Rateliff R, Millar B, Madden R (2002) Molecular diversity of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* isolated from pigs at slaughter by *flaA*-RFLP analysis and ribotyping. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 49: 388-393.
10. Patton C, Wachsmuth I, Evins G, Kiehlbauch J, Pliikaytis B, Troup N, *et al.* (1991) Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1525-1530.
11. Petersen L, Newell D (2001) The ability of Fla-typing schemes to discriminate between strains of *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol.* 91: 217-224.
12. Vandamme P, De Ley J (1991) Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 451-455.
13. Wassenaar T, Newell D (2000) Genotyping of *Campylobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1-9.
14. Weijtens M, Reinders R, Urlings H, Van der Plas J (1999) *Campylobacter* infections in fattening pigs: excretion pattern and genetic diversity. *J. Appl. Microbiol.* 86: 63-70.