

ESTANDARIZACION DE UNA TECNICA DE REACCION EN CADENA DE POLIMERASA Y COMPARACION CON EL METODO DE CULTIVO CONVENCIONAL PARA EL DIAGNOSTICO DE *Campylobacter jejuni* EN CARNE DE POLLO

¹Mireya Lamping L; ²Gaby Dolz

¹Facultad de Ciencia Animal, Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua, Apartado 453. e-mail: faca@ibw.com.ni

²Programa de Postgrado en Microbiología, Parasitología y Química Clínica, Universidad de Costa Rica

RESUMEN

Se estandarizó una prueba de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de *Campylobacter jejuni* en carne de pollo.

El método de cultivo convencional (MCC) se utilizó como método de referencia para la detección de la bacteria. De un total de 385 muestras analizadas, el PCR detectó 45 (11.7%) muestras positivas, mientras que el MCC detectó 25 (6.5%) muestras positivas. Comparado con el MCC, el PCR mostró una sensibilidad de 100%, una especificidad de 94.4%, valor predictivo positivo de 55.5% y valor predictivo negativo de 100%. El PCR mostró una concordancia diagnóstica de 0.68 comparado con el MCC. Con la técnica de PCR se obtuvieron resultados con mayor rapidez, se redujo el costo y el tiempo de procesamiento de una muestra, finalmente la especificidad de la prueba evita el riesgo de dar falsos positivos



ABSTRACT

A method of a polymerase Chain reaction was standardized in order to detect *Campylobacter jejuni* infection in Chicken meat.

A conventional culture method was used as a reference (MCC) in order to detect the bacteria. Out of 385 analyzed samples, the PCR detected 45 (11.7%) positive samples, whereas the MCC detected 25 (6.5%) positive samples. When comparing the MCC methods, with the PCR, the last one shows a sensibility of 100%, a specificity of 94.4%, a positive predictive value of 55.5% and a negative predictive value of 100%. The PCR shows a diagnostic concordance of 0.68 compared to MCC, which shows a diagnostic concordance of ????. With the PCR technique, the results were obtained in shorter time, and cost and the

time of processing one sample were reduced. Finally, the specificity of the routine avoids the risk of gives false positives.

A *Campylobacter jejuni* se le considera una de las causas más importantes de enteritis en humanos, la cual se transmite generalmente a través de los alimentos. La bacteria habita como flora normal en el tracto intestinal de las aves, y se transmite a otros animales por vía fecal-oral. En el humano, la infección ocurre generalmente por el consumo de carne de pollo contaminada al momento de la matanza (Park *et al.*, 1991; Kist, 1986; Antillón *et al.*, 1987).

La técnica de diagnóstico comúnmente utilizada para detectar la presencia de *C. jejuni* en alimentos es el método de cultivo convencional (MCC), considerada como técnica de oro. Para identificar la bacteria a nivel de especie y subespecie se realizan una serie de reacciones bioquímicas, las cuales son analizadas al final por API-Campy (sistema computacional de la Cía. Biomérieux Francia, descrito por Barret *et al.*, 1988). La prueba de hidrólisis de hipurato es una prueba de fermentación tradicional. Esta prueba ha servido para la diferenciación de *C. jejuni* (hipurato +) y *C. coli* (-), pero la misma ha sido cuestionada debido a la posibilidad de la existencia de cepas de *C. jejuni* hipurato negativas y cepas de *C. coli* hipurato positivas (López *et al.*, 1994).

En la actualidad se han implementado diferentes técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con la finalidad de realizar discriminación entre *Campylobacter* y otros microorganismos. Se han utilizado secuencias filogenéticamente conservadas como la del gen 16S rRNA para la determinación del género *Campylobacter*, pero con éstas no se ha logrado discriminar entre las especies *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, porque están cercanamente relacionadas. Para ese propósito es necesario el uso de iniciadores más específicos.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar y validar la técnica de PCR para la detección de *Campylobacter jejuni* en carne de pollo, utilizando el MCC como método de referencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Area de estudio, población en estudio, método de muestreo fueron realizados de igual forma que en el primer artículo. Análisis laboratorial:

Para el cultivo convencional (MCC), las muestras se cultivaron en una placa petri con medio selectivo de Preston a 42°C por 48 horas en jarra con sobre de Campy-Gen oxid. Seguidamente se les realizó una tinción de Gram y pruebas bioquímicas confirmando la especie *C. jejuni* si los resultados fueron: negativo en el medio de tripticasa soya, positivo al ácido sulfhídrico, positivo a la reacción de nitrato y nitrito, negativo a la reacción de carbohidratos (glucosa y sacarosa), sensible al ácido nalidíxico, resistente a la cefalotina y positivo a las pruebas de oxidasa y catalasa. Las muestras que resultaron positivas a las pruebas bioquímicas se subcultivaron en el medio especial de API-Campy (sistema de identificación de *Campylobacter* de la Cía. Biomérieux, Francia, descrita por Barret *et al.*, 1988), la cual confirmó el perfil bioquímico de la especie *C. jejuni* subespecie *jejuni*.

Cuando se utilizó la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR), las muestras recolectadas y conservadas en medio de transporte de Stuart se procedieron a cultivar con 50 ml de medio de enriquecimiento LB-Broth para su posterior extracción de ADN. La extracción de ADN fue realizada en base al protocolo de "Extraction of ADN from bacteria". El botón se resuspendió en 200 µl tampón STET (8 % sucrosa, 50mM Tris-base pH 8.0, 50 mM EDTA y 0.1% Triton X-100). Se le adicionaron 50 mg/ml de lisozima y se incubó a temperatura ambiente por 5 min, posteriormente a 94°C por 1 min. Se adicionó

SDS al 0.5%, proteínasa-K con una concentración final de 100 mg/ml y esta mezcla fue incubada a 37°C por 1 hora. Luego se agregó NaCl al 0.5 M, 1/10 parte de solución de CTAB/NaCl (5% cetyl-trimethylammonium bromine, 0.5 M NaCl), se mezcló e incubó a 65°C por 10 min. Al final se extrajo el ADN con cloroformo, etanol absoluto, etanol de 70% y se pusieron a secar por 3 minutos en centrifuga al vacío (Speed WAC-Labconco). Una vez secados, se resuspendieron en tampón TE (10 mM Tris base pH de 7.4, 1mM EDTA), dejándolos a 37°C en baño María toda la noche. El ADN en solución se cuantificó en espectrofotómetro Beckman DU-600.

Los iniciadores utilizados en este estudio fueron diseñados por González *et al.* (1997) para la determinación específica de *Campylobacter jejuni*. El iniciador delantero estaba compuesto por 5'-CCT-GCTACGGTCAAAGTTTTGC -3' y el iniciador reverso estaba compuesto por 5'-GATCTTTTTGTTTTGTGCTGC-3' de *Campylobacter jejuni* (publicado en el Gen-Bank, número de acceso 002163). El producto específico generado por el par de iniciadores fue de 793 bp. Como control positivo se utilizó *Campylobacter jejuni* cepa 33560 (ATCC).

Para la estandarización del protocolo de PCR se probaron diferentes concentraciones de iniciadores y de ADN, finalmente se seleccionó el protocolo con las condiciones óptimas utilizando un volumen total de 20 µl: 50 mM KCl, 10 mM Tris-base, pH-8.3, 0.2 mM dATP, 0.2 mM dCTP, 0.2 mM dGTP y 0.2 mM dTTP, 77 mM concentración final para el iniciador delantero, y 68 mM concentración final para el iniciador reverso, MgCl₂ al 1.5 mM, 1.5 U de enzima *Thermus aquaticus* (Taq)- ADN Polimerasa, 20 ng /µl de la muestra o cepa control positivo. Las mezclas fueron sometidas a los siguientes ciclos en el termociclador Gen-Amp PCR-System 2400 (Perkin-Elmer): 95°C por 3 min, 10 ciclos de 95 °C por 45 seg, 52°C por 1.20 min, 72°C por 45 seg. , seguido de 27 ciclos de 90°C por 45 seg, 52°C por 1.20 min, 72°C por 45 seg y 72°C por 5 min como prolongación final. Para ser observado el producto amplificado se preparó un gel de agarosa al 2% según el protocolo de Maniatis *et al.* (1987).

RESULTADOS

Mediante el PCR se determinaron 45 (11.7%) muestras positivas y 340 (88.3%) muestras negativas a *C. jejuni*. En contraste, con el MCC se determinaron 25 (6.5%) muestras positivas y 360 (93.5%) muestras negativas a *C. jejuni* (Tabla 1).

Las muestras se consideraron positivas con "producto específico" en el PCR cuando aparecía la banda con peso molecular de 793 bp, como en el control positivo, y como positivas con "producto no específico" cuando aparecían bandas con peso molecular mayor al presentado en el control positivo.

Diez Muestras reaccionaron positivas en el PCR con "producto específico", de éstas, 6 muestras se confirmaron positivas en MCC y 4 muestras resultaron negativas en MCC. De un total de 35 muestras positivas en el PCR con "producto no específico" 19 muestras se confirmaron positivas por el MCC y 16 resultaron negativas en MCC (Tabla 1).

Tabla 1. Detección de muestras reconocidas con producto específico y producto no específico con respecto al control positivo de *Campylobacter jejuni* en carne de pollo mediante PCR y MCC.

		MCC		Total
		+	-	
P	Producto específico	6 (1.6%)	4 (1.0%)	10 (2.6%)
C	Producto no específico	19 (4.9%)	16 (4.2%)	35 (9.1%)
R	Muestras negativas	0	340 (88.3%)	340 (88.3%)
Total		25 (6.5%)	360 (93.5%)	385 (100%)

Al comparar el PCR con el MCC (prueba de referencia), se determinó una sensibilidad de 100%, una especificidad de 94.4%, un valor predictivo positivo de 55.5% y un valor predictivo negativo de 100%. Comparado con el MCC el PCR mostró una concordancia diagnóstica de 0.68.

En el Tabla 2 se muestran las muestras positivas detectadas en el matadero y expendios mediante MCC y PCR. Ambas técnicas determinaron la mayor cantidad de muestras positivas en las fases AS y PE, sin embargo en las fases de empaque del matadero y expendios el PCR detectó 15 (3.89 %) muestras positivas, mientras que el MCC, solamente logró detectar 6 (1.55 %) muestras positivas (Tabla 2).

alimento de origen aviar. La técnica demostró tener una alta sensibilidad y especificidad, así como la capacidad para procesar muchas muestras simultáneamente, reduciendo el tiempo de procesamiento y evitando el riesgo de dar falsos positivos.

Durante el estudio se pudo demostrar que el MCC presentó menor sensibilidad que el PCR. Sin embargo, para la determinación de la bacteria hasta nivel de subespecie es conveniente el uso del MCC.

La comparación de las técnicas permitió determinar que existe una concordancia diagnóstica aceptable y además que el PCR es específico y más sensible que el MCC.

Tabla 2. Datos comparativos de muestras positivas con *Campylobacter jejuni* en carne de pollo diagnosticadas mediante PCR y MCC.

Puntos críticos	+ PCR	+ MCC
AS	14/96	10/96
PE	13/96	8/96
TR	3/96	1/96
FEMA	3/96	3/96
FEEC-1	8/96	2/96
FEEC-2	4/96	1/96
TOTAL	45/385	25/385

CONCLUSIONES

Por primera vez en Costa Rica y Centroamérica se logró establecer en el área de diagnóstico laboratorial la estandarización de un protocolo de PCR específico para la detección de *C. jejuni*.

El PCR parece ser una técnica prometedora para utilizarse como alternativa de diagnóstico rápido en las empresas procesadoras de

Ambas técnicas determinaron la mayor cantidad de muestras positivas en las fases AS y PE, sin embargo en las fases de empaque del matadero y expendios el PCR detectó 15 (3.89 %) muestras positivas, mientras que el MCC solamente logró detectar 6 (1.55 %) muestras como positivas.

LITERATURA CITADA

- ANTILLON, F., E. ODIO., & V. GARCÍA.** 1987. Presencia de *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* en pollos frescos del Area Metropolitana de San José, Costa Rica. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas, CenDEISSS*, 8: 39-41.
- BARRETT, T.J., C.M. PATTON AND G.K. MORRIS.** 1988. Differentiation of *Campylobacter* species using phenotypic characterization. *Lab. Med.* 19:96-102.
- GIESENDORF B. A. J. BELKUM A.V.; KOEKEN A.; STEGEMAN H.; HENKENS H.C.; PLASS J. ; GOOSSEN H.; NIESTERS G.M. AND QUINT W.G.** 1993. Development of species-specific DNA Probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by Polymerase Chain Reaction Fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:1541-1546.
- GONZALEZ I.; GRANT K. A.; RICHARDSON P. T.; PARK C. E. AND COLLINS M.D.** 1997. Specific Identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by Using a PCR Test Based on the *ceu-E*-gene Encoding a Putative Determinant. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 759-763.
- KIST M.** 1985. The historical background of *Campylobacter* infection: new aspects. In: Pearson AD, editor. *Proceedings of the 3rd International Workshop on Campylobacter Infections*; Ottawa;1985 Jul 7-10. London: Public Health Laboratory Service; p.23-7.
- PARK R, GRIFFITHS P, MORENO G.** 1991. Sources and survival of campylobacters: relevance to enteritis and the food industry. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 20:97S-106S.