

Prueba piloto para la identificación del *Campylobacter jejuni*, en heces fecales de pacientes con y sin manifestaciones clínicas de enfermedad diarreica aguda, en una institución prestadora de servicio en salud de la ciudad de Barranquilla, mediante PCR múltiple

Meibys Piedad Espinosa Mejia

Trabajo de Investigación o Tesis Doctoral como requisito para optar el título de
Magister en Genética

Tutores

MSc. Ludís Oliveros Ortiz

PhD. Antonio Acosta Hoyos

Antecedentes: Durante los últimos años el *Campylobacter* es foco de investigaciones en el mundo por ser reconocida como una carga sustancial para la salud pública. Estos microorganismos que generan gran interés mundial, debido a que posee un grado alto de supervivencia; son capaces de sobrevivir en diferentes tipos de ambientes y condiciones, codifican resistencia a los antibióticos y son causante de un incremento en la morbimortalidad en los últimos años.

Es causante de la campilobacteriosis que es una zoonosis causada por la bacteria *Campylobacter jejuni* manifestándose de forma asintomática o causando enteritis bacteriana y enfermedad diarreica aguda (EDA) con alteraciones clínicas severas. Esta bacteria se puede adquirir por el consumo de alimentos y aguas contaminados y puede pasar desapercibido por falta de un diagnóstico específico.

Objetivos: Identificar *Campylobacter jejuni*, aislada en heces fecales de pacientes con y sin manifestaciones clínicas de enfermedades diarreicas agudas en una institución prestadora de servicio de salud en la ciudad de Barranquilla, mediante técnica de PCR múltiple.

Materiales y Métodos: Se hizo una prueba piloto donde se recolectaron 9 muestras de heces fecales de pacientes con y sin manifestaciones clínicas de EDA en una institución prestadora de servicio en salud en Barranquilla. Para la identificación de género y especie se hizo mediante métodos microbiológicos convencionales y métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La extracción del ADN bacteriano se realizó utilizando el kit DNA DNeasy (Quiagen) utilizando el protocolo descrito por la casa comercial. La PCR Múltiple se realizó en el Termociclador CFX96, utilizando cebadores específicos para el gen 16S rRNA

para identificar género y el gen *cia-B* específico para especie de *Campylobacter jejuni*. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

Resultados: De acuerdo a las pruebas microbiológicas que se realizaron se pudo determinar que 2 de las 9 muestras dieron como resultado positivo para la identificación de género *Campylobacter* spp, sin embargo estas no fueron suficientes para determinar la especie.

Por otra parte mediante la utilización de PCR múltiple y cebadores específicos para la determinación de género y especie de *Campylobacter jejuni*, pudimos identificar que las dos muestras obtenidas como positiva, corresponden a *Campylobacter jejuni*. Sumado a esto se realizó una medición de tiempo de ambas técnicas que nos permitió identificar con cual de ellas se podría obtener una mayor rendición de tiempo y precisión en el resultado, se pudo identificar el género y especie del *C. jejuni*, se pudo obtener este resultado en menor tiempo. Se evidenció que por métodos microbiológicos se tomó para la identificación de la bacteria 7 días, sin incluir la especie comparado con los métodos moleculares de PCR múltiple que solo tomó 24 horas.

Conclusiones: En este estudio fueron analizadas 9 muestras de heces, todas provenientes de un servicio de salud de la ciudad de Barranquilla, se realizaron y compararon dos métodos diferentes microbiológicos y PCR múltiple, para la identificación de género y especie del *Campylobacter jejuni*, es importante resaltar que los métodos microbiológicos son confiables, para diagnosticar el *Campylobacter*, pero con las pruebas realizadas no fue posible establecer la especie, por lo que no fue específico, otra de las desventajas que presenta es el tiempo que se utiliza para la identificación, se requiere de 7 días para obtener un resultado, lo que no permite entregar un resultado oportuno, en cambio la PCR tiene la ventaja de identificar género y especie en menor tiempo 24 horas, siendo este una gran ventaja para implementar programas preventivos y correctivos para la Campilobacteriosis. Los resultados de esta prueba piloto, denota la urgente necesidad de realizar estudios a gran escala para determinar la epidemiología y prevalencia del *Campylobacter jejuni* en el campo clínico en diferentes poblaciones y condiciones y en el campo industrial.

Palabras clave: EDA, Campylobacteriosis, PCR, Zoonosis, *Campylobacter jejuni*.

ABSTRACT

Background: During the last years, *Campylobacter* has been the focus of research in the world because it is recognized as a substantial burden on public health. These microorganisms that generate great world interest, because they have a high degree of survival; they are capable of surviving in different types of environments and conditions, they encode resistance to antibiotics and are the cause of an increase in morbidity and mortality in recent years.

It is the cause of campylobacteriosis which is a zoonosis caused by the *Campylobacter jejuni* bacteria manifesting asymptotically or causing bacterial enteritis and acute diarrheal disease (ADD) with severe clinical alterations. This

bacterium can be acquired through the consumption of contaminated food and water and can go unnoticed for lack of a specific diagnosis.

Objective: To identify *Campylobacter jejuni*, isolated in feces from patients with and without clinical manifestations of acute diarrheal diseases in an institution that provides health services in the city of Barranquilla, using multiple PCR technique.

Materials and Methods: A pilot test was carried out where 9 stool samples were collected from patients with and without clinical manifestations of ADD, in a health service provider institution in Barranquilla. For the identification of genus and species, it was done using conventional microbiological methods and molecular methods such as the Polymerase Chain Reaction (PCR). The extraction of bacterial DNA was carried out using the DNA DNeasy kit (Quiagen), using the protocol described by the commercial house and Multiplex PCR was performed in the CFX96 Thermal Cycler, using specific primers for the 16S rRNA gene to identify genus and the *cia-B* gen of *Campylobacter jejuni* species. The PCR product was analyzed by gel electrophoresis. 2% agarose.

Results: According to the microbiological tests that were carried out, it was determined that two of the 9 samples gave positive results for the identification of the genus *Campylobacter* spp, however these were not enough to determine the species. On the other hand, by using multiplex PCR and specific primers for the determination of the genus and species of *Campylobacter jejuni*, we were able to identify that the two samples obtained as positive correspond to *Campylobacter jejuni*. In addition to this, a time measurement of both techniques was carried out that allowed us to identify with which of them a greater yield of time and precision in the result could be obtained, the genus and species of *C. jejuni* could be identified, this could be obtained result in less time. It was evidenced that by microbiological methods, it was taken for the identification of the bacteria 7 days, not including the species compared to the molecular methods of multiplex PCR that only took 24 hours.

Conclusions: In this study, 9 stool samples were analyzed, all from a health service in the city of Barranquilla, two different microbiological methods and multiple PCR were carried out and compared, for the identification of the genus and species of *Campylobacter jejuni*, it is important to highlight that Microbiological methods are reliable, to diagnose *Campylobacter*, but with the tests carried out it was not possible to establish the species, so it was not specific, another of the disadvantages that it presents is the time used for identification, it requires 7 days to obtain a result, which does not allow to deliver a timely result, on the other hand, PCR has the advantage of identifying genus and species in less time 24 hours, this being a great advantage to implement preventive and corrective programs for *Campylobacteriosis*. The results of this pilot test denote the urgent need for large-scale studies to determine the epidemiology and prevalence of *Campylobacter jejuni* in the clinical field in different populations and conditions and in the industrial field.

KeyWords: EDA, *Campylobacteriosis*, PCR, Zoonosis, *Campylobacter jejuni*.

REFERENCIAS

- (1) Robert C Reiner Jr. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis* 2018; 18: 1211–28. September 19, 2018 [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)

- (2) Bernadeta Szczepanska ¹, Małgorzata Andrzejewska , Dorota Spica , Jacek J Klawe Prevalencia y resistencia a los antimicrobianos de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aislados de niños y fuentes ambientales en zonas. *BMC Microbiol* . 2017; 17: 80. Publicado en línea el 4 de abril de 2017 PMID: PMC5379741

- (3) Julia Lackner, Michael Weiszl, Christine Muller-Graf, Matthias Greiner. The disease burden associated with *Campylobacter* spp. in Germany, 2014-2019. *Journal List PLoS One* 14(5); 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6519833/>

- (4) WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne diseases burden epidemiology reference group. 2007-2015. https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/ferg-report/en/

- (5) Nancy Rivera F., Raúl Bustos B., Sonia Montenegro. Et, al Genotipificación y resistencia antibacteriana de cepas de *Campylobacter* spp aisladas en niños y en aves de corral. *Rev Chil Infect* 2011; 28 (6): 555-562

- (6) Aboilgwaran y Anthony Ifeanyi Okoh. *Campylobacteriosis* humana: un problema de salud pública de importancia mundial.

- (7) Urbano-Cáceres E, Aguilera-Becerra A, Jaimes-Bernal C, Pulido-Medellín M. *campylobacter* spp., in churn storage of raw cow's milk in Tunja - Boyacá. *REVISTA MVZ CORDOBA*. 2018 Sep; 23(3):

- (8) Hombre SM. La importancia clínica de las especies emergentes de *Campylobacter* *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8 : 669 - 685

- (9) Victoria Rodríguez Gutiérrez; Libia Guzmán Osorio, Noel Verjan García. et, al. *Campylobacter* spp. in poultry products and its impact in public health

- (10) JOSIANE DA SILVA Quetz ¹, ILA FERNANDA NUNES LIMA ¹, ALEXANDRE HAVT. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* en niños de comunidades del noreste de Brasil: detección molecular y relación con el estado nutricional. Szczepanska et al. *BMC Microbiology* (2017) 17:80

- (11) European Food Safety Authority (EFSA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA)
- (12) Herlice do Nascimento Veras ,Pedro HQS Medeiros. Asociación de genes de virulencia de *Campylobacter jejuni* y biomarcadores inmunoinflamatorios con deterioro del crecimiento en niños del noreste de Brasil. *Revista europea de microbiología clínica y enfermedades infecciosas volumen 37*
- (13) Butzler J.P. 2004. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin Microbiol Infect* 10: 868-76.
- (14) Herrera D, Guevara D, Badilla D, Rivera D. infección por campylobacter en humanos revision a proposito del primer caso de septicemia en costa rica [internet]. binasss.sa.cr. 2020 [cited 15 august 2020]. availablefrom: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmhnn/v19n11984/art2.pdf>
- (15) Levy A.J. 1946. A gastro-enteritis cutbreak probably due to a bovine strain of vibrio. *Yale J Biol Med* 18: 243-58.
- (16) Ribot E.M., Fitzgerald C., Kubota K., Swaminathan B., and Barrett T.J. 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol*.
- (17) Adriana del Carmen Gutiérrez Castillo* Leopoldo Henri Paasch Martínez* Norma Leticia Calderón Apodaca*Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundoVeterinaria Méxicoversión impresa ISSN 0301-5092Vet. Méx vol.39 no.1 México ene./mar. 2008.
- (18) Lisette Lapierre A. Factores de Virulencia asociados a especies zoonóticas de *Campylobacter* spp. *Avances en Ciencias Veterinarias V28 N° 1 AÑO 2013*.
- (19) Microbiología. Tortora, funke, case Edición: 9ª Editorial MEDICA PANAMERICANA.
- (20) *Campylobacter* spp. en productos aviares y su impacto en salud pública-Victoria Rodríguez Gutiérrez, Libia Guzmán Osorio1, *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia / Volumen 10 / Número 2 / julio – diciembre de 2015*.
- (21) Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global epidemiology of campylobacter infection. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28:687-720.

- (22) Urbano-Cáceres E, Aguilera-Becerra A, Jaimes-Bernal C, Pulido-Medellín M. *Campylobacter* spp., in churn storage of raw cow's milk in Tunja - Boyacá. REVISTA MVZ CÓRDOBA. 2018 Sep; 23(3): p. 6871-6877.
- (23) Adriana del Carmen Gutiérrez Castillo* Leopoldo Henri Paasch Martínez* Norma Leticia Calderón Apodaca Salmonellosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo Veterinaria México versión impresa ISSN 0301-5092 Vet. Méx vol.39 no.1 México ene./mar. 2008.
- (24) Swaminathan A, Torresi J, Schlagenhaut P, Thursky K, Wilder-Smith A, Connor BA, Schwartz E, Vonsonnenberg F, Keystone J, O'Brien DP. 2009. A global study of pathogens and host risk factors associated with infectious gastrointestinal disease in returned international travellers. J Infect 59:19–27. doi:10.1016/j.jinf.2009.05.008.
- (25) Hernandez *Campylobacter*, lider en patologia intestinal infeccioso discurso de ingreso como la real academia de medicina de la C. valenciana.
- (26) Ketley, JM (1997) Patogenia de la infección entérica por *Campylobacter*. Microbiología 143, 5 - 21.
- (27) Van Vliet, AHM, Wood, AC, Henderson, J., Wooldridge, KG, Ketley, JM (1998a) Manipulación genética de especies de *Campylobacter* entéricas. Métodos en microbiología 27, 407 - 419.
- (28) Fernández H. 2011. *Campylobacter* y campylobacteriosis: una visión desde América del Sur. Rev Peru Med Exp Salud Publica 28: 121–127. doi: 10.1590 / S1726-46342011000100019.
- (29) Raimond Lugert 1, Uwe Groß 1, Andreas E. Zautner. *Campylobacter jejuni*: factores de adherencia e invasión de células eucariotas- Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 128, Edición 3/4 (2015), páginas 0–7.
- (30) Javid I. Dasti, A. Malik Tareen, Raimond Lugert, Andreas E. Zautner, Uwe Groß. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. International Journal of Medical Microbiology. 2010.
- (31) Nuijten, PJM, Bartels, C., Bleumink-Pluym, NMC, Gaastra, W., Van Der Zeijst, BAM (1990a) Tamaño y mapa físico del cromosoma de *Campylobacter jejuni*. Investigación de ácidos nucleicos 18, 6211 - 6214.
- (32) Whitehouse, CA, Balbo, PB, Pesci, EC, Cottle, DL, Mirabito, PM, Pickett, CL (1998) La toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni*

provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase G2 . Infección e Inmunidad 66 , 1934 - 1940.

- (33) Eyigor, A., Dawson, KA , Langlois, BE , Pickett, CL (1999b) Genes de toxina de distensión citoletal en aislados de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* : detección y análisis por PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1.646 mil - 1.65 mil
- (34) Fry, BN, Feng, S. , Chen, YY , Newell, DG , Coloe, PJ , Korolik, V. (2000) El gen galE de *Campylobacter jejuni* está implicado en la síntesis y virulencia de lipopolisacáridos . *Infección e Inmunidad* 68, 2594 - 2601 .
- (35) Fry, BN, Korolik, V. , Ten Brinke, JA , Pennings, MTT , Zalm, R. , Teunis, BJJ , Coloe, PJ , Van Der Zeijst, BAM (1998) El locus de biosíntesis de lipopolisacáridos de *Campylobacter jejuni* 81116 . *Microbiología* 144, 2049 - 2061.
- (36) Whitehouse, CA, Balbo, PB , Pesci, EC , Cottle, DL , Mirabito, PM , Pickett, CL (1998) La toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni* provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase G2 . *Infección e Inmunidad* 66, 1934 - 1940. Ketley, JM (1997) Patogenia de la infección entérica por *Campylobacter* . *Microbiología* 143, 5 - 21 .
- (37) Grant, KA y Park, SF (1995) Caracterización molecular de katA de *Campylobacter jejuni* y generación de un mutante de *Campylobacter coli* deficiente en catalasa por intercambio alélico interespecífico . *Microbiología* 141, 1369 - 1376.
- (38) Ziprin, RL, Young, CR , Stanker, LH , Hume, ME , Konkel, ME (1999) La ausencia de colonización cecal de polluelos por un mutante de *Campylobacter jejuni* que no expresa la proteína de unión a fibronectina bacteriana. *Enfermedades de las aves* 43, 586 - 589.
- (39) Kopper G, Calderón G, Schneider S, Domínguez W, Gutiérrez G. *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y veterinaria n° 6. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; 2009*
- (40) Konkel, ME, Kim, BJ , Rivera-Amill, V., Garvis, SG (1999) Se requieren proteínas secretadas por bacterias para la internalización de *Campylobacter jejuni* en células de mamífero cultivadas . *Microbiología molecular* 32, 691 - 701.
- (41) Grant, KA, Belandia, IU , Dekker. N., Richardson, PT , Park, SF (1997) Caracterización molecular de pldA , el gen estructural de una fosfolipasa A

de *Campylobacter coli*, y su contribución a la hemólisis asociada a células. *Infección e Inmunidad* 65, 1172 - 1180. Guerry, P., Logan, SM, Thornton, S., Trust, TJ (1990) Organización genómica y expresión de genes de flagelina de *Campylobacter*. *Journal of Bacteriology* 172, 1 853 - 1860.

- (42) Caldwell, MB, Guerry, P., Lee, EC, Burans, JP, Walker, RI (1985) Expresión reversible de flagelos en *Campylobacter jejuni*. *Infección e inmunidad* 50, 941 - 943.
- (43) Wassenaar, TM, Bleumink - Pluym, NMC, Newell, DG, Nuijten, PJ, Van Der Zeijst, BAM (1994) Expresión diferencial de flagelina en un mutante *flaA flaB +* de *Campylobacter jejuni*. *Infección e inmunidad* 62, 3901 - 3906.
- (44) Nuijten, PJM, Van Asten, FJAM, Gaastra, W., Van Der Zeijst, BAM (1990b) Análisis estructural y funcional de dos genes de flagelina de *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry* 265, 17 798 - 17 804.
- (45) Wassenaar, TM, Bleumink - Pluym, NMC, Van Der Zeijst, BAM (1991) La inactivación de los genes de flagelina de *Campylobacter jejuni* mediante recombinación homóloga demuestra que se requiere *flaA* pero no *flaB* para la invasión. *Revista EMBO* 10, 2055 - 2061.
- (46) Wooldridge, KG, Williams, PH, Ketley, JM (1996) Transducción de señales del huésped y endocitosis de *Campylobacter jejuni*. *Patogenia microbiana* 21, 299 - 305. DOI: 10.1006 / mpat.1996.0063
- (47) Hugdahl, MB, Beery, JT, Doyle, MP (1988) Comportamiento quimiotáctico de *Campylobacter jejuni*. *Infección e Inmunidad* 56, 1560 - 1566.
- (48) Whitehouse, CA, Balbo, PB, Pesci, EC, Cottle, DL, Mirabito, PM, Pickett, CL (1998) La toxina de distensión citoletal de *Campylobacter jejuni* provoca un bloqueo del ciclo celular en la fase G2. *Infección e Inmunidad* 66, 1934 - 1940.
- (49) Field, LH, Headley, VL, Payne, SM, Berry, LJ (1986) Influencia del hierro en el crecimiento, morfología, composición de proteínas de la membrana externa y síntesis de sideróforos en *Campylobacter jejuni*. *Infección e Inmunidad* 54, 126 - 132.
- (50) Ketley, JM (1997) Patogenia de la infección entérica por *Campylobacter*. *Microbiología* 143, 5 - 21.
- (51) Kuroki, S., Saida, T., Nukina, M., Haruta, T., Yoshioka, M., Kobayashi, Y., Nakanishi, H. (1993) Las cepas de *Campylobacter jejuni* de pacientes con síndrome de Guillain-Barré pertenecen principalmente al serogrupo 19

de Penner y contienen residuos de beta- N- acetilglucosamina . Annals of Neurology 33, 243 - 247.

- (52) Bersudsky, M., Rosenberg, P., Rudensky, B., Wirguin, I. (2000) Los lipopolisacáridos de un aislado de *Campylobacter coli* de un paciente con síndrome de Guillain-Barre muestran un mimetismo de gangliósidos . Los trastornos neuromusculares 10, 182 - 186 . DOI: 10.1016 / s0960-8966 (99) 00106-6.
- (53) Endtz, HP, Ang, CW , Van Den Braak, N., Duim, B., Rigter, A., Price, LJ , Woodward, DL, Rodgers, FG, Johnson, WM , Wagenaar, JA , Jacobs, BC , Verbrugh, HA, Van Belkum, A. (2000) Caracterización molecular de *Campylobacter jejuni* de pacientes con Síndromes de Guillain-Barre y Miller Fisher . Journal of Clinical Microbiology 38, 2297 - 2301.
- (54) Storz, G. & Imlay, JA (1999) Estrés oxidativo . Current Opinions in Microbiology 2, 188 - 194.
- (55) Pesci, EC, Cottle, DL , Pickett, CL (1994) Estudios genéticos, enzimáticos y patogénicos de la superóxido dismutasa de hierro de *Campylobacter jejuni* . Infección e inmunidad 62, 2687 - 2694.
- (56) Purdy, D. y Park, SF (1994) Clonación, secuencia de nucleótidos y caracterización de un gen que codifica la superóxido dismutasa de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* . Microbiología 140 , 1203 - 1208.
- (57) Konkel, ME, Kim, BJ , Klena, JD , Young, CR , Ziprin, R. (1998) Caracterización de la respuesta al estrés térmico de *Campylobacter jejuni* . Infección e inmunidad 66, 3666 - 3672.
- (58) Thies, FL, Karch, H. , Hartung, HP , Giegerich, G. (1999a) La proteína ClpB de *Campylobacter jejuni* : caracterización molecular del gen codificante y antigenicidad de la proteína recombinante . Gene 230, 61 - 67 . DOI: 10.1016 / s0378-1119 (99) 00054-2.
- (59) Thies, FL, Karch, H. , Hartung, HP , Giegerich, G. (1999b) Clonación y expresión del gen dnaK de *Campylobacter jejuni* y antigenicidad de la proteína de choque térmico 70 . Infección e Inmunidad 67, 1194 - 120.