



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

Utilidad del PCR para detectar a *Campylobacter jejuni*
directamente de muestras de heces

Utility of PCR to detect *Campylobacter jejuni* directly from stool
samples.

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA
ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA

AUTORES

Rosa Maria Chumpitaz Hernandez

Monica Raquel Ruiz Velesvilla

ASESORA

Msc. Manuela Renee Verastegui Pimentel

CO-ASESORA

Dr. Yanet Valdez Tejeira

LIMA - PERÚ

1997

JURADO

Presidente: Dr. JOSE ANTONIO AGUILAR OLARTE

Vocal: Dr. JAIME COK GARCIA

Secretario: Dr. GERMAN BENITO ARAGON

Fecha de Sustentación: junio de 1997

Calificación: Aprobado

ASESORES DE TESIS

ASESORA

Msc. Manuela Renee Verastegui Pimentel

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0002-7500-1353

CO-ASESORA

Dr. Yanet Valdez Tejeira

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0009-0009-7005-9714

DEDICATORIA

A nuestras asesoras Msc. Manuela VERASTEGUI y Dr. Yanet VALDEZ, promotoras de este estudio de Investigación; ejemplos de disciplina y trabajo, que gracias a su acertado asesoramiento y dedicación hicieron posible la culminación de la presente Tesis de Investigación.

AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Robert Gilman, nuestro más sincero agradecimiento por su valiosa ayuda en el desarrollo de la presente tesis de Investigación.

A todo el personal Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciones de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, nuestro agradecimiento.

RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

Utilidad del PCR para detectar a *Campylobacter Jejuni* directamente de muestras de heces

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

16%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	dgsa.uaeh.edu.mx:8080 Fuente de Internet	3%
2	Y.H. Carlosama-Rosero, H. Bolaños-Bravo, C.H. Sierra-Tórres, E.A. Rosero. "Asociación de los genotipos cagA, vacA e IceA de <i>H. pylori</i> con la gastritis crónica y folicular en una población colombiana con alto riesgo de cáncer gástrico", <i>Revista de Gastroenterología de México</i> , 2019 Publicación	2%
3	www.fmz.unam.mx Fuente de Internet	2%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
5	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	1%
6	Sanchez García Anna Karina, Sotres Quezada Norma Laura. "Estandarización de las técnicas : pcr (reacción en cadena de la polimerasa)	1%

TABLA DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II.GENERALIDADES.....	5
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
IV. RESULTADOS.....	26
V. DISCUSION.....	31
VI. CONCLUSIONES.....	34
VII. RECOMENDACIONES.....	35
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

RESUMEN

Para facilitar la identificación rápida y específica de *Campylobacter jejuni* se desarrolló un Test de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de muestras de heces de niños, con problemas gastrointestinales, menores de 24 meses de edad. Los cebadores (primers) elegidos, CAMPYJ y CAMPYJ2, para la realización del PCR se diseñaron sobre la base de una secuencia específica del gen MapA, este gen codifica a la proteína A (24KD), que es parte estructural de la membrana celular, presente en todas las cepas de *Campylobacter jejuni*. Para la extracción de ADN directamente de heces se evaluaron 04 protocolos diferentes, mostrando el Método de Franket y col. un ADN genómico más puro y conservado. Para la estandarización del PCR se utilizaron cepas de *Campylobacter jejuni*, cuyo límite de detección con el par de cebadores fue 15 bacterias, equivalente a 100 fentogramos de ADN de cepa pura de *C. jejuni* y de 1.5×10 bacterias, equivalente a 1 picogramo de ADN en muestra de heces. Para determinar la sensibilidad y especificidad del PCR se utilizaron 33 muestras de heces positivas y 56 muestras de heces negativas a *Campylobacter jejuni*; asimismo el PCR no evidenció reacción cruzada con otros enteropatógenos. Determinándose una sensibilidad y especificidad de 88% y 84% respectivamente; resultados que demuestran que el PCR es una buena alternativa de diagnóstico para la rápida detección de *Campylobacter jejuni* directamente de muestras de heces.

Palabras Clave: PCR, *Campylobacter*, *jejuni*.

ABSTRACT

To facilitate the rapid and specific identification of *Campylobacter jejuni*, a Polymerase Chain Reaction (PCR) test was developed from stool samples of children with gastrointestinal problems under 24 months of age. The primers chosen, CAMPYJ and CAMPYJ2, for PCR were designed on the basis of a specific sequence of the MapA gene, this gene encodes protein A (24KD), which is a structural part of the cell membrane, present in all *Campylobacter jejuni* strains. For DNA extraction directly from feces, 04 different protocols were evaluated, with the Franket et al. method showing a purer and more conserved genomic DNA. For PCR standardization, *Campylobacter jejuni* strains were used, whose limit of detection with the primer pair was 15 bacteria, equivalent to 100 phentograms of DNA of pure strain of *C. jejuni* and 1.5 x10 bacteria, equivalent to 1 picogram of DNA in stool sample. To determine the sensitivity and specificity of the PCR, 33 stool samples positive and 56 stool samples negative for *Campylobacter jejuni* were used; likewise, the PCR did not show cross-reactivity with other enteropathogens. A sensitivity and specificity of 88% and 84%, respectively, were determined; results that demonstrate that PCR is a good diagnostic alternative for the rapid detection of *Campylobacter jejuni* directly from stool samples.

Keywords: PCR, *Campylobacter*, *jejuni*.

I. INTRODUCCIÓN

Las especies de *Campylobacter* termofílicos son reconocidas como una de las mayores causas de enfermedades diarreicas agudas en humanos de todas partes del mundo. Las tres especies más comúnmente reconocidas como implicadas en enteritis en orden descendente de importancia son: *Campylobacter jejuni*, *coli* y *lari* (1,2,3,4,5).

Campylobacter jejuni, la especie predominante, es demostrada en heces de pacientes con diarrea por encima del 14% y es responsable de más de 2 millones de casos de infección en USA anualmente (2,6).

Campylobacter jejuni es causa importante de diarrea en niños menores de 1 año de edad en Lima. Este microorganismo es hallado en el 15% de pacientes con diarrea y la mayoría con diarrea disintérica; y requiere para la infección solamente un número bajo de campylobacters, aproximadamente 500 bacterias (7,8).

En el Perú las fuentes de infección de *Campylobacter jejuni*, además del agua y la leche rancia, son las aves de corral, en donde se aisló a *Campylobacter jejuni* en el 88% de gallinas comerciales y 50% de gallinas domésticas (8,9); esto podría aumentar la infección por *Campylobacter jejuni* en niños de bajos recursos económicos los cuales se encuentran en contacto directo con este tipo de aves, debido a las precarias condiciones de salubridad con que cuentan.

Los métodos de detección de *Campylobacter jejuni*, bacteria gram negativa, microaerofílica espirilada, resistente al ácido nalidíxico, diferenciado por los

laboratorios de microbiología por dar una reacción positiva a la Hidrólisis del Hipurato (3,5); son diversos.

Así tenemos el cultivo de *Campylobacter jejuni*, el cual requiere un aislamiento de la bacteria en un medio selectivo, en condiciones adecuadas de microaerofilia por un periodo mínimo de tres días, al cabo del cual el reconocimiento de las colonias de *Campylobacter* en el medio puede ser dificultoso por varias razones: primero la contaminación de la flora fecal puede crecer más que *campylobacter*, segundo que esta flora bacteriana fecal puede imitar las colonias del mismo y en tercer lugar las colonias de *Campylobacter* no pueden siempre manifestarse en grandes cantidades; por lo que se recurre a una identificación bioquímica necesaria para diferenciar las diferentes especies de *Campylobacters* (5,10), sin embargo las pruebas utilizadas actualmente, como es el caso de la prueba de la Hidrólisis del Hipurato no son enteramente concluyentes, ya que existen cepas de *Campylobacter jejuni* que dan reacción negativa a la Hidrólisis del Hipurato; asimismo este microorganismo es sensible al oxígeno atmosférico por lo que hace necesario el uso de medios de transporte para mantener su viabilidad y poder ser detectados por el cultivo. Por ello diversos investigadores reportan una sensibilidad del cultivo que varía entre un 75 a 85%.

Por consiguiente la recuperación y correcta identificación de *Campylobacter jejuni* en muestras de heces, requiere un tiempo prolongado para su detección e identificación; por lo que la mayoría de laboratorios en nuestro país opta por obviar su identificación, debido a estas dificultades

Por lo tanto la identificación de *Campylobacter jejuni* es dificultosa; siendo necesaria su correcta identificación por ser una causa de diarrea, especialmente en niños. Asimismo es importante su aislamiento para el estudio de la susceptibilidad a determinados antibióticos, conocer su epidemiología y patogenicidad; además la diferenciación entre *Campylobacter jejuni* y *C. coli* es de significancia epidemiológica por lo que se hacen necesarios métodos adicionales para su identificación.

Por consiguiente, diferentes investigadores, en el campo de la microbiología desarrollan alternativas de diagnóstico rápido y preciso de infecciones producidas por bacterias, hongos y virus, particularmente aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico directo y cultivo, como es el caso de *Mycobacterium*, Rotavirus, *Salmonella typhi* y *Clostridium*; basados en pruebas genéticas (15, 16).

La utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha revolucionado la vía de diagnóstico; anteriormente el diagnóstico de muchas enfermedades incluía tomar de 5 a 10 ml de sangre, seguido de un largo protocolo con un mínimo de 4 a 5 días para identificar el microorganismo (5). Con el PCR es posible en muchos casos obtener el resultado en menos de 10 horas, con una mínima cantidad de muestra. Este avance es de importancia para algunos Laboratorios de diagnóstico tanto en términos de aspecto experimental del trabajo, como para perfeccionar el servicio ofrecido al paciente.

El PCR es una técnica que permite una amplificación enzimática rápida de una secuencia específica de ADN y puede ser un método de detección altamente

sensible y específico. Por su sensibilidad el PCR permite la identificación directa de bacterias de difícil crecimiento y aislamiento en medios de cultivo de muestras clínicas, como es el caso de *Campylobacter jejuni*.

Los beneficios y ventajas del uso del PCR para la temprana y rápida detección de diferentes microorganismos, causantes de infecciones entéricas, directamente de muestras de heces; nos condujo a realizar el presente estudio: **“UTILIDAD DEL PCR PARA DETECTAR A CAMPYLOBACTER JEJUNI DIRECTAMENTE DE MUESTRAS DE HECES”** en la sección de Biología Molecular del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la “Universidad Peruana Cayetano Heredia”. Los objetivos trazados fueron los siguientes:

1. Estandarización de un método de extracción de ADN directamente de muestras de heces.
2. Estandarización del Método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección específica de *Campylobacter jejuni* en heces humanas.
3. Determina reacciones cruzadas, sensibilidad y especificidad de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar a *Campylobacter jejuni* en heces humanas.

II.GENERALIDADES

El género *Campylobacter* está integrado por bacilos curvos, delgados, gram negativos, de 0,2 - 0,8 um de ancho por 0,5 – 5 um de largo, ocasionalmente bacilo espiralado o en forma de S, motiles gracias a la acción de un único flagelo polar en uno de los extremos, son microaerofílicos o anaerobios y tienen un tipo respiratorio de metabolismo, no fermentan, ni oxidan los carbohidratos (5).

Campylobacter jejuni representa uno de los agentes causales más comunes de gastroenteritis bacteriana en niños acompañada algunas veces de sangre, dolor abdominal, fiebres, náuseas y a veces vómitos (7,14).

Este microorganismo puede ser algunas veces aislado de muestras de sangre además de las heces (5,15).

La fuente de infecciones humanas usualmente en los alimentos de origen animal, los microorganismos son excretados en las heces de animales domésticos sanos en un 50 - 100% de estos animales; *Campylobacter jejuni* puede ser aislado también de superficies de agua (2,16). Los mecanismos patogénicos de *Campylobacter jejuni*, la presencia de sangre y leucocitos en las heces de personas infectadas indican que *Campylobacter jejuni* puede ser invasivo, sin embargo una forma secretoria ocurre especialmente e niños sugiriendo la implicación con una enterotoxina parecida al colera confirmados por ensayos biológicos e inmunológicos descubriendo las propiedades de la enterotoxina lábil al calor (5).

Para el diagnóstico de *Campylobacter jejuni* las muestras de heces, hisopados o lavados rectales de pacientes con diarrea tienen métodos convencionales como la examinación directa al microscopio la cual es una técnica útil para la identificación

rápida presuntiva en casos de diarreas aguda en la que se requiere usar una fase de contraste o un microscopio de campo oscuro y observar la motilidad confusa y rápida de bastones espirilados (5,15). También se puede usar la coloración de cristal violeta que permite observar los pequeños bastones curvados, pero se requiere de la suficiente experiencia de los investigadores, para poder identificarlos.

Otro método, es el uso de medios selectivos para aislar a *Campylobacter*, sin embargo es dificultoso debido a que requiere condiciones especiales de cultivo asimismo el limitado número de test bioquímicos que existen para una adecuada discriminación entre las especies de *Campylobacter*, como por ejemplo la discriminación de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* que depende solamente del Test de la hidrólisis del hipurato; siendo el

Aislamiento de *Campylobacter jejuni* el método estándar utilizado para su diagnóstico (5,15).

El diagnóstico serológico es el método más útil en pacientes bacteriológicamente negativos, pero no son prácticos para el diagnóstico de casos esporádicos de infección debido a la heterogeneidad antigénica del organismo.

Métodos de Latex aglutinación se han desarrollado para la confirmación de una variedad de organismo incluyendo *Campylobacter*, estos kits comerciales son provechosos para la confirmación del cultivo, tenemos: Campy Slide, Microscreen *Campylobacter* y Meritec Campy estos usan anticuerpos específicos, en este caso reaccionan con cepas de *Campylobacter jejuni* o *Campylobacter coli* y las partículas de látex los cuales aglutinan y dan una reacción visible estos métodos tienen

excelente sensibilidad y especificidad para la identificación, pero no discriminan entre *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*.

El advenimiento de la tecnología del ADN, y el descubrimiento de la Reacción Cadena de la Polimerasa han revolucionado el diagnóstico médico, permitiendo la detección temprana, rápida y precisa de infecciones producidas por bacterias, virus, hongos y parásitos (16,17,18,19) particularmente aquellos microorganismos difíciles de detectar por análisis microbiológico directo y cultivo, como es el caso de *Campylobacter jejuni*, ya que las dificultades de rutina en la detección, aislamiento, e identificación de este microorganismo, hace del PCR una técnica ideal para la identificación de esta bacteria microaerofílica; técnica que será aplicada posteriormente en todos los métodos de Diagnóstico Clínico (20).

FUNDAMENTO DE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):

El término "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR se aplica al proceso bioquímico, enzimático in vitro, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por el ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y 30) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso (21).

En general los componentes requeridos para un PCR son: ADN iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúan como

blanco para la amplificación: mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs), solución amortiguadora de reacción y ADN polimerasa.

Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos determinados por temperaturas tiempos específicos, que son:

1. Desnaturalización (92 - 98°C, 30 a 90 segundos), en el cual desnaturalizan las dos cadenas complementarias del ADN blanco.
2. Alineación (50 - 60°C, 30-60 segundos), en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de ADN blanco desnaturalizado.
3. Extensión (70 - 74°C, 30 a 90 segundos) en el que el ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

El ciclo siguiente se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción, pero contiene ahora el doble de cadenas sencillas de ADN blanco que el anterior y finaliza convirtiendo éstas en cadenas dobles.

Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial (2^n) del segmento de ADN blanco, cuyo tamaño se define desde los primeros ciclos de la reacción. La longitud del segmento amplificado por la Reacción en cadena de la Polimerasa es el resultado de la suma de la longitud de los dos iniciadores más la distancia del ADN blanco flanqueado por éstos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN:

De Julio de 1996 a Marzo de 1997 se realizó el presente estudio con cuatro diferentes poblaciones pertenecientes a un protocolo de investigación Viral realizado por el Laboratorio de Bacteriología del NAMRID en convenio con el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Patología de la "Universidad Peruana Cayetano Heredia" en los años 95 - 96, las mismas que nos fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bacteriología del NAMRID.

10 Cepas de *Campylobacter jejuni* cultivadas en el laboratorio de Bacteriología del NAMRID.

33 muestras de heces de niños menores de 24 meses de edad que concurren a la Unidad de Rehidratación Oral del "Hospital del Niño" en los años 95-96, cuyos cultivos realizados en el Laboratorio de Bacteriología del NAMRID dieron resultado positivo a *Campylobacter jejuni*.

56 muestras de heces de niños menores de 24 meses de edad que concurren a la Unidad de Rehidratación Oral del "Hospital del Niño" en los años 95-96, cuyos cultivos realizados en el Laboratorio del NAMRID dieron resultado negativo a *Campylobacter jejuni*.

10 muestras de heces de niños menores de 24 meses de edad que concurren a la Unidad de Rehidratación Oral del "Hospital del Niño" en los años 95-96, cuyos cultivos realizados en el Laboratorio del NAMRID dieron resultado positivo a otros enteropatógenos: *Campylobacter coli*, *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.*,

Shiguella sonnei, Shiguella flexneri, Aeromona spp, Salmonella (GR B), Salmonella (Non Typhi), Escherichia coli, Vibrio cholerae (Non 01).

2. METODOLOGÍA

A. ELECCIÓN DE LOS CEBADORES:

Los cebadores específicos para *Campylobacter jejuni* usados en este estudio fueron los recomendados por Urs STUCKI y Col.(26), quienes clonaron y caracterizaron un gen de *Campylobacter jejuni*, denominado gen Mapa (915 pb). El gen Mapa codifica al a proteína A (24 KDa) la cual es parte estructural de la membrana celular. Se ha demostrado que la secuencia del gen Mapa es específica para *Campylobacter jejuni*. El referido estudio obtuvo el 100% de sensibilidad y especificidad de estos cebadores al trabajar con cepas puras (22).

Los cebadores seleccionados fueron sintetizados en la Universidad de Johns Hopkins:

- El primero denominado CAMPYJ1 de 18 nucleótidos:

5' ATGTTTAAAAATTTTGTG 3'

- El segundo denominado CAMPYJ2 de 20 nucleótidos:

5' AAGTTCAGAGATTAAGTAG 3'

para generar un fragmento de ADN de *Campylobacter jejuni* de 642 pares de base.

B. ESTANDARIZACION DE LOS CEBADORES

Para estandarizar la concentración de Cebadores a usar se procedió

(a) Se disolvió los cebadores liofilizados en 1 ml de agua destilada estéril.

(b) Se calculó el peso total de cada uno de los cebadores mediante la determinación de la absorbancia en espectrofotómetro a 260 nm: (un OD=33 ug/ml)

- CAMPYJ1 17,9 OD resultando 590,7 ug/ml

- CAMPYJ2 19,0 OD resultando 627 ug/ml.

(c) Se determinó el peso molecular de cada uno de los cebadores:

- CAMPYJ1 tiene 18 pb dando un peso molecular de 5940 gmol

- CAMPYJ2 tiene 20 pb dando un peso molecular de 6600 gmol

(d) Con los datos obtenidos se procedió a realizar los cálculos para obtener la concentración de cada cebador:

- El Cebador CAMPYJ1:

peso total del cebador = 590,7ug/ml

$M = \text{peso molecular de} = 940 \text{ g/mol} = 99,4 \text{ uM}$

cantidad diluyente = 0,001lt

- El Cebadores CAMPYJ2:

peso total del cebador = 627ug/ml

$M = \text{peso molecular} = 6600\text{g/mol} = 95 \text{ uM}$

Cantidad diluyente = 0,001 lt

Una vez obtenida la concentración de los cebadores se procedió a estandarizar el volumen de cebadores a usar en el PCR para obtener una concentración final de reacción de 0,25 uM.

C. CONDICIONES DE CULTIVO DE CAMPYLOBACTER JEJUNI

De las 10 cepas bacterianas de *Campylobacter jejuni* de heces de humanos, que se encontraban en TSB más glicerol, se tomaron 100 ul, para recuperarla en Agar Columbia con 5% de sangre estéril de carnero desfibrinada e incubadas microaerofílicamente a 42,5°C por 48 horas. Las colonias típicas de *Campylobacter* se confirmaron por coloración Gram y la tipificación se realizó mediante pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa e hidrólisis del hipurato, a los cuales mostraron reacción positiva.

D. EXTRACCIÓN DE ADN DE CEPAS DE CAMPYLOBACTER JEJUNI

Se procedió a extraer ADN de las 10 cepas confirmadas de *Campylobacter jejuni* por método de "QUIAGEN" mediante el siguiente protocolo:

1. Se cosechó toda la placa con el cultivo de *Campylobacter jejuni* confirmado.
2. En un eppendorf estéril se colocó 180 ul de Buffer ATL. Inmediatamente se añadió con un asa de siembra el pool de bacterias, agitando vigorosamente en un vortex.
3. Se agregó 20 ul de proteinasa K y se mezcló por inversión.
4. Se incubó en baño de agua a 55°C por 3 horas.
5. Se añadió 200 ul de Buffer AL. e incubó a 70°C por 10 minutos.
6. Se añadió 210 ul de etanol y se traspasó a:
7. Un tubo colector con spin column y se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto.

8. Se colocó el spin columna en otro tubo colector (desechando el anterior) y se agregó 500 ul de buffer de lavado AW y se centrifugó a 10,000 rpm. por 1 minuto.
9. Se colocó el spin columna en otro tubo colector (descartando el anterior) y se agregó 500 ul de buffer A W y se centrifugó a 10,000 rpm. por 3 minutos.
10. Se colocó el spin columna en un eppendorf estéril y se agregó 200 ul de agua destilada estéril pre-calentada a 70°C en Baño de agua. Se centrifugó a 10,000 rpm. por 1 minuto y se descartó el spin columna.
11. Se procedió a rotular el eppendorf conteniendo el ADN extraído y luego se midió su concentración.

E. MEDICION DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN EXTRAIDO DE CEPAS PURAS DE CAMPYLOBACTER JEJUNI

1. Se preparo gel de agarosa al 2%.
2. Se preparo la cámara de corrida electroforética con Buffer TAE 1X.
3. Se utilizo como patrón, concentraciones conocidas de un marcador Lambda de 10 ng/ul
4. Se añadió a los pozitos del gel de agarosa el ADN extraídos de las cepas bacterianas de Campylobacter jejuni las cuales previamente fueron mezcladas con buffer de muestra 6x.
5. Se procedió a la corrida por espacio de 30 minutos a un voltaje de 100 voltios.

6. Se realizó el análisis de las concentraciones respectivas de ADN comparándolas con el patrón mediante el uso del transiluminador de UV.

F. ESTANDARIZACIÓN DE PCR PARA DETECTAR ADN DE CEPAS PURAS DE CAMPYLOBACTER JEJUNI

EXPERIMENTO N° 01:

Para estandarizar la técnica del PCR para detectar a *Campylobacter jejuni* partimos de un protocolo utilizado por muchos investigadores para realizar esta técnica.

1. Las concentraciones de los reactivos que se usó según el protocolo original son los siguientes:

- 10 ng de ADN genómico de las cepas pura de *Campylobacter jejuni* aisladas de muestras de heces humanas procedimos a añadirlo a una mezcla de 50 ul conteniendo:

- Buffer 1x: conteniendo 50 mM cloruro de potasio y 10 mM Tris- HCl (PH:8,3).

- 2.5 mM de Cloruro de Magnesio

- 170 uM de dNTPs

- 0,25 uM de cada cebador

- 2,5 U/ul de taq DNA polimerasa

2. Luego procedimos a elegir las condiciones de amplificación teniendo en cuenta el T_m de los cebadores para alinearse al ADN blanco consistiendo en 35 ciclos de:

- Denaturación a 94°C por 1 minuto.
- Hibridación a 35°C por 1 minuto
- Extensión a 74°C por 1 minuto.
- Un paso final adicional de extensión a 74°C por 5'.

3. 20 μl del producto amplificado se analizó en gel de agarosa al 2 % usando el marcador de peso molecular Ladder 100 pares de bases.

4. Con este experimento no se evidenció productos de amplificación.

EXPERIMENTO N° 02:

En este experimento se procedió a:

- El cloruro de magnesio fue disminuido a una concentración de 1.5 mM.
- Y utilizar una concentración más baja de ADN genómico para poder disminuir la concentración de inhibidores presentes en este tipo de muestra. Para lo cual realizamos el siguiente experimento:

1. Se utilizó **concentraciones de ADN de 2 ng y 5 ng** los cuales se añadieron a una mezcla de 50 μl conteniendo:

- Buffer 1x: conteniendo 50mM cloruro de potasio y 10 mM Tris- HCl (PH:8.3).

- **1,5 mM de Cloruro de Magnesio.**
 - 170 uM dNTPs.
 - 0,25 uM de cada cebador
 - 2,5 U/ul de taq DNA polimerasa
2. Utilizamos las mismas condiciones de amplificación:

35 ciclos de:

- Denaturación a 94°C por 1 minuto.
 - Hibridación a 35°C por 1 minuto
 - Extensión a 74°C por 1 minuto.
 - Un paso final adicional de extensión a 74°C por 5'.
3. 20 ul del producto amplificado se analizó en gel de agarosa al 2% usando el marcador de peso molecular Ladder 100 pares de bases.
4. Con este experimento se evidenció productos de amplificación inespecíficas, y formación de dímeros.

EXPERIMENTO N° 03:

En este experimento se procedió a cambiar condiciones de amplificación, utilizando las mismas concentraciones de los reactivos; porque al parecer la temperatura de alineación no era la más óptima para que los Cebadores se unan específicamente a la secuencia complementaria. Así se procedió a aumentar la Temperatura de hibridación:

1. 35 ciclos de:

- Denaturación a 94°C por 1 minuto.

- Hibridación a 38°C por 1 minuto

- Extensión a 72°C por 30 segundos.

- Un paso final adicional de extensión a 72°C por 5'.

2. 20 ul del producto amplificado se analizó en gel de agarosa al 2% usando el marcador de peso molecular ladder 100 pares de bases.

3. En este experimento se evidencio menos bandas inespecíficas.

EXPERIMENTO N° 04:

En este experimento aumentamos la temperatura de hibridación nuevamente.

. Un paso previo de Denaturación a 94°C por 1 minuto.

35 ciclos de:

- Denaturación a 94°C por 1 minuto.

- **Hibridación a 42°C por 1 minuto**

- Extensión a 72°C por 1'30"

. Un paso final adicional de extensión a 72°C por 5'.

20 ul del producto amplificado se analizó en gel de agarosa al 2% usando el marcador de peso molecular Ladder 100 pares de bases.

Este experimento evidenció una única banda de 642 pares de bases, correspondiente a la longitud de la secuencia que deseábamos detectar del Gen MapA de *Campylobacter jejuni*.

G. SENSIBILIDAD DE PCR PARA DETECTAR ADN DE CAMPYLOBACTER JEJUNI DE CEPAS PURAS

Para determinar la sensibilidad de los Cebadores se procedió a:

1. Obtener cepas bacterianas de cultivo de *Campylobacter jejuni*.
2. Se realizó la dilución de bacterias de *Campylobacter jejuni* a una concentración de $1,5 \times 10^8$ bacterias/ml.
3. De esta concentración se procedió a realizar 8 diluciones en eppendorf estériles con 1 ml de PBS hasta obtener una concentración de 1,5 bacterias/ml.
4. Se realizó la extracción de ADN de cada concentración.
5. Se ensayo el PCR siguiendo la metodología estandarizada con 5 μ l de la extracción pura diluida al décimo; con controles positivo y negativo.
6. Luego se corrió los productos obtenidos en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio; con marcador de peso molecular ladder de 100 pares de bases.
7. Se visualizaron los productos amplificados con el transiluminador de UV.

H. EXTRACCIÓN DE ADN DE CAMPYLOBACTER JEJUNI EN MUESTRAS DE HECES HUMANAS

Para la extracción de ADN de *Campylobacter jejuni* de muestras de heces se procedió a realizar cuatro protocolos los cuales fueron repetidos:

PROTOCOLO N° 01 (Método Triton X-100 1%)

1. En un eppendorf se pesó 100 mg de heces y se agregó 1 ml de PBS. Agitando vigorosamente y se centrifugó a una velocidad 3,500 rpm. por 5 minutos.
2. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a una velocidad de 10.000 rpm. por 3 minutos.
3. Se decantó el sobrenadante. Al pellet se agregó 1 ml de PBS 0,05 M (PH 7,4) y se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm. por 3 minutos.

Decantando el sobrenadante (Repetir 4 veces)

4. Al pellet se le agregó 1 ml de agua destilada y se centrifugó a una velocidad de 10,000 pm. por 3 minutos. Decantando el sobrenadante.
5. Se agregó 100 ul de agua destilada y 100 ul de Tritón X-100 al 1% y se hirvió por 5 minutos.
6. Inmediatamente se enfrió en agua helada y se guarda a -20°C hasta su uso.

PROTOCOLO N°02 (Método Quelex):

1. En un eppendorf se pesó 100 mg de heces y se agregó 1ml de PBS. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a una velocidad de 3,500 rpm. por 1 minuto.
2. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante.
3. Se agregó:

- 20 ul de solución de digestión (Tween 20 al 5% y Tris-HCl 200 mM)
 - 10ul de Proteinasa K.
4. Se agitó vigorosamente e incubó 3 horas a 56°C.
 5. Se agregó 400 ul de Quelex e incubó por 30 minutos a 56°C.
 6. Se hirvió por 8 minutos y se centrifugó por 1 minuto a 3,500 rpm.

PROTOCOLO N° 03 (Método Lysosima):

1. En un eppendorf se pesó 100 mg de heces y se agregó 1 ml de PBS. Agitar vigorosamente y se centrifugó a una velocidad de 3,500 rpm. por 1 minuto.
2. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm. Por 10 minutos. Descantando el sobrenadante.
3. Al pellet se añadió 500 ul de lysosima 10 mg/ml. (resuspender en T.E.).
4. Se agitó y se incubó una hora a 37°C.
5. Se agregó: - 6 ul de Proteinasa K(20mg/ml) y 70 ul de SDS al 10%.
6. Se agitó y se incubó 3 horas a 56°C.
7. Se agregó 100 ul de NaCl 5 M, se incubó por 10 minutos a 65°C.
8. Se agregó fenol - Cloroformo - OH isoamil, volumen por volumen.
9. Agitar despacio y centrifugar a 3,500 rpm. por 3 minutos. Se separó el sobrenadante.

10. Se agregó Cloroformo - OH isoamil y se centrifugó y separar el sobrenadante.
11. Se agregó 500 ul de OH absoluto y se dejó por 15 minutos a -70°C toda la noche a -20°C .
12. Se centrifugo a una velocidad 10,000 rpm. por 10 minutos. Decantándose el sobrenadante.
13. Se agregó alcohol de 70% y se centrifugó a 10,000 rpm. por 3 minutos. Se decantó el alcohol y se dejó secar bien.
14. Se resuspendió en 30 ul de agua de PCR. Guardándose a -20°C hasta su uso.

PROTOCOLO N° 04 (Método Frankel y Col.):

1. En un eppendorf se pesó 100 mg de heces y se agregó 1ml de PBS. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a una velocidad de 3,500 rpm. por 1 minuto.
2. Se separó el sobrenadante y se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm. por 5 minutos. De decantó el sobrenadante.
3. Al pellet se añadió 75 ul de una solución conteniendo:

Sucrosa al 20%

Tris -HCL 50 mM.

EDTA 50 mM.
4. Se añadió 10 ul de Iysosima a una concentración de 25 mg/ml.

5. Se agitó vigorosamente y se incubó en Baño de agua por 30 minutos a 37°C.
6. Se agregó 300 ul de una solución conteniendo:

NaCl 50 mM.

SDS 1%.
7. Se agregó 20 ul de Proteinasa K (20 mg/ml).
8. Se agitó vigorosamente y se incubó 2 horas a 56°C
9. Se agregó fenol - Cloroformo -OH isoamil (25:24:01) el mismo volumen.
10. Se agitó despacio y se centrifugó a 3,500 rpm. por 3 minuto. Se separó el sobrenadante.
11. Se agregó Cloroformo -OH isoamil (24:01) el mismo volumen. Se centrifugó y se separó el sobrenadante.
12. Se agregó 800 ul de OH absoluto y 20 ul de acetato de sodio 3 M. Se dejó por 15 minutos a -70° o toda la noche a -20°C.
13. Se centrifugó a una velocidad de 10,000 rpm. por 12 minutos. Decantándose el sobrenadante.
14. Se agregó alcohol de 70% y se centrifugó a 10,000 rpm. por 5 minutos. Decantándose el alcohol y se dejó secar bien.
15. Se resuspendió en 50 ul de agua de PCR. Se guardó a -20°C hasta su uso.

I. ESTANDARIZACIÓN DE PCR PARA DETECTAR ADN DE CAMPYLOBACTER JEJUNI DIRECTAMENTE DE HECES HUMANAS

Utilizando el ADN extraído de heces con los 04 protocolos de extracción se procedió a realizar el PCR estandarizado con cepa pura para determinar el método de extracción a usar, mostrándonos el Método de Franket y Col. una banda tenue de 642 pares de bases.

Para mejorar esta banda se modificaron las condiciones de amplificación del PCR estandarizado, procediéndose a subir la temperatura de hibridación para que los Cebadores se unan específicamente al ADN blanco de *Campylobacter jejuni*. Las condiciones fueron:

. Un ciclo previo de:

- Denaturación a 94°C por 1 minuto.
- Hibridación a 45°C por 1 minuto
- Extensión a 72°C por 35 segundos.

35 ciclos de:

- Denaturación a 94°C por 1 minuto.
- Hibridación a 43°C por 1 minuto.
- Extensión a 72°C por 35 segundos.

J. SENSIBILIDAD DE LOS CEBADORES PARA DETECTAR ADN DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* DIRECTAMENTE DE HECES.

Para determinar la sensibilidad de los Cebadores se procedió a:

1. Obtener muestras de heces negativas a cultivo de *Campylobacter jejuni*.

2. Se realizó a la dilución de bacterias de *Campylobacter jejuni* comparando con la escala de

Marc Farlan de 0.5 (1.5×10^8 bacterias/ml.)

3. De esta dilución se procedió a realizar 08 diluciones en eppendorf esteriles con 1 ml de PBS hasta obtener una concentración de 1.5 bacterias/ml.

4. Inmediatamente a cada eppendorf se le contaminó con 100 mg de las heces negativas, agitando vigorosamente.

5. Se siguió con el procedimiento de extracción de ADN de heces (Método de Frankel y Col.).

6. Una vez extraído el ADN de las heces contaminadas con diferentes concentraciones de bacterias de *Campylobacter jejuni*. Se realizó el PCR siguiendo la metodología estandarizada para muestras de heces con 5 ul de la extracción pura y diluida al décimo; con controles positivo y negativo.

7. Luego se corrió los productos obtenidos en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio; con el marcador de peso molecular Ladder 100 pares de bases.

Se evidenciaron los productos amplificados de 642 pares de bases con el transiluminador de UV.

K. REACCIONES CRUZADAS DE PCR PARA DETECTAR ADN DE OTRAS ENTEROBACTERIAS

Se procesaron 10 muestras de heces de niños positivos a otros enteropatógenos: *Campylobacter coli*, *Campylobacter spp.*, *Shiguella spp.*, *Shiguella sonnei*, *Shiguella flexneri*, *Aeromona spp.*, *Salmonella (GR B)*, *Samonella (Nontyphi)*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae (Non 01)*, procediéndose a extraer el ADN de cada una de las muestras y el respectivo PCR.

L. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE PCR PARA DETECTAR ADN DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

Se procedió a extraer ADN de 33 muestras de heces positiva a *Campylobacter jejuni* y 56 muestras negativas al mismo. Inmediatamente después se procedió a realizar el PCR estandarizado para muestras de heces.

IV. RESULTADOS

1. ESTANDARIZACION DEL PCR EN CEPA DE CAMPYLOBACTER JEJUNI

Las 10 cepas de *Campylobacter jejuni* fueron sometidas a extracción de ADN por el método de "QUIAGEN" y sometidos a 04 experimentos consecutivos para estandarizar las concentraciones de reactivos y condiciones de amplificación del PCR hasta obtener una nítida banda de 642 pares de bases, obtenido con el experimento N°04.

Asimismo el par de cebadores CAMPYJ1 y CAMPYJ2 detectó en cepa pura hasta 15 bacterias de *Campylobacter jejuni* (según escala Marc Farlan) que equivale a 100 fentogramos de ADN extraído de cepa. (Fotografía Nro. 01)



2. ELECCION DEL METODO DE EXTRACCION DE DNA DE MUESTRAS DE HECES:

Se probaron 04 protocolos de extracción de ADN directamente de muestras de heces: Método de Tritón X-100, Método Chelex, Método Lysosima, y Método Franket y Col. utilizados por diversos investigadores. De las extracciones obtenidas se utilizó 5 ul. de cada protocolo y diluciones de 1:10 y 1:50, los mismos que fueron sometidos a PCR estandarizado en cepa pura. Los productos obtenidos fueron visualizados en gel de agarosa con bromuro de etidio, utilizando transiluminador de UV.

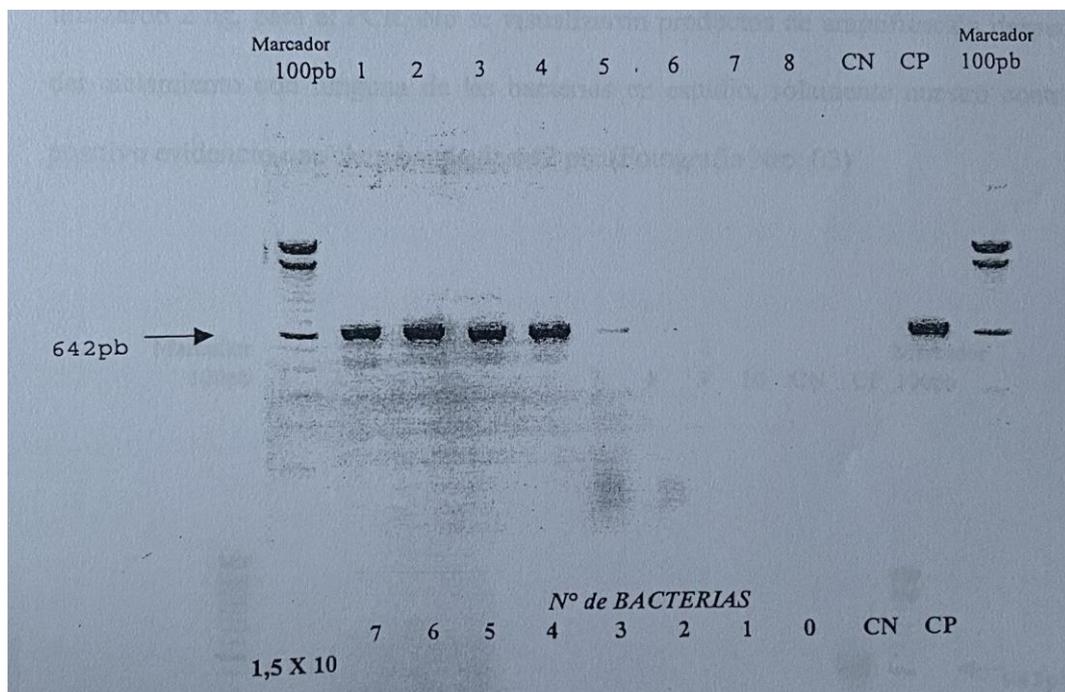
Los resultados obtenidos fueron los siguientes: con el método lysosima no se obtuvieron productos de amplificación, con el método Triton X-100 y Chelex mostraron además de nuestra banda, otras bandas inespecíficas; con el método de Franket y Col. (Protocolo N°04) nosotros solamente visualizamos una única banda de 642 pb, tamaño correspondiente al fragmento del Gen MapA de *Campylobacter jejuni*, por lo que optamos por su elección.

3. ESTANDARIZACION DEL PCR PARA DETECTAR A CAMPYLOBACTER JEJUNI DIRECTAMENTE DE HECES

Se procedió a realizar modificaciones en las condiciones de amplificación del PCR estandarizado en cepa pura; con la finalidad de mejorar el producto de 642 pares de bases obtenido con el método de extracción de ADN de Franket y Col. para lo cual se aumentó la temperatura de hibridación a 45°C para darle mayor especificidad a

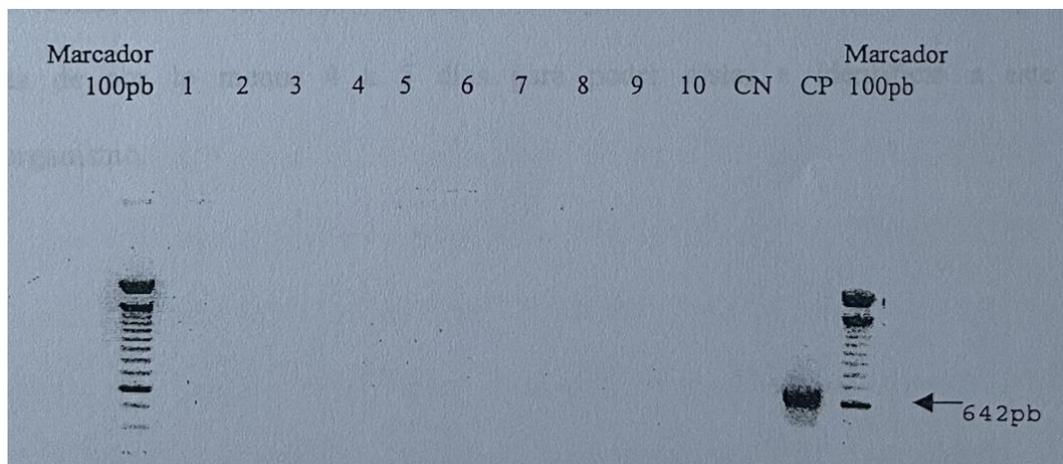
los cebadores de acoplarse al ADN blanco de *Campylobacter jejuni* presente en las heces; obteniéndose así una banda mucho más consistente.

Una vez estandarizado el PCR para amplificar el ADN de *Campylobacter jejuni* directamente de muestras de heces se probó la sensibilidad de los Cebadores CAMPYJ1 Y CAMPYJ2, cuyo límite de detección fue de 1.5×10^2 bacterias (según escala de Marc Farlan) lo cual corresponde a 1 picogramo de DNA presente en 100 mg de heces. (Fotografía Nor.02)



4. REACCIONES CRUZADAS DEL PCR CON MUESTRAS DE HECES POSITIVAS A OTRAS ENTEROBACTERIAS:

Se probaron 10 muestras de heces de niños con infecciones diarreicas positivas a otras enterobacterias diferentes *Campylobacter jejuni*: *Campylobacter coli*, *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Aeromona spp.*, *Salmonella (GR B)*, *Samonella (Non Typhi)*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae (Non 01)* las misma que fueron sometidas a extracción de ADN, de las cuales se utilizaron 2 ng. para el PCR. No se visualizaron productos de amplificación después del ciclamiento con ninguna de las bacterias en estudio, solamente nuestro control positivo evidencio una clara banda de 642 pb. (Fotografía Nro. 03).



5. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL PCR PARA DETECTAR A CAMPYLOBACTER JEJUNI EN MUESTRAS DE HECES:

De las 33 muestras de heces de niños con enfermedades diarreicas positivas por cultivo a infección por *Campylobacter jejuni*, 29 fueron positivas por PCR, mientras que se reportaron 04 falsos negativos (sensibilidad 88%). De las 56 muestras de heces de niños analizados por cultivo con resultado negativo a *Campylobacter jejuni*, 47 fueron negativos por PCR y 09 fueron falsos positivos (especificidad 84%).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando la prueba de Chi cuadrado y la prueba de Mac Nemar.

6. RAPIDEZ DEL PCR VS CULTIVO PARA DETECTAR A CAMPYLOBACTER JEJUNI DIRECTAMENTE DE HECES:

El procedimiento del PCR para detectar a *Campylobacter jejuni* directamente de heces reporta resultados en solamente un día de trabajo, en contraste con el cultivo que necesita de por lo menos 4 a 5 días para poder aislar e identificar a este microorganismo.

V. DISCUSION

La identificación de *Campylobacter jejuni*, causante de infecciones diarreicas agudas, especialmente en niños, mediante cultivo, no es utilizada como rutina de Diagnóstico en muchos Laboratorios de Microbiología de nuestro país, debido a las dificultades que presentan durante su aislamiento e identificación, al mismo que se suma su baja sensibilidad (10⁴ bacterias por gramo de heces) y el consumo de tiempo.

Por tanto, nosotros investigamos el uso potencial del PCR por su alta sensibilidad y especificidad, en la identificación de este microorganismo, usando un set de Cebadores CAMPYJ1 Y CAMPYJ2 (perteneciente a una porción altamente conservada del gen MapA de *Campylobacter jejuni* con una sensibilidad y especificidad de 100% reportada por Stucki y Col), como herramienta para el temprano y sensible diagnóstico inicial de la infección por *Campylobacter jejuni* en heces.

Inicialmente estandarizamos las concentraciones de los reactivos intervinientes en el PCR a utilizar con Cepa pura de *Campylobacter jejuni* como se describe en la metodología, en el cual 35 ciclos de amplificación fueron suficientes para detectar 100 fentogramos de ADN que equivale a 15 bacterias presentes en la muestra por consiguiente evidenciar una

banda de 642 pb. visible en gel de agarosa al 2% coloreado con bromuro de etidio; resultados similares a los obtenidos por Stucki y Col. en cepa pura de *Campylobacter jejuni*. Sin embargo nuestro objetivo principal fue detectarlo en heces, para lo cual se probaron 04 diferentes protocolos de extracción de ADN de

muestras de heces, los cuales fueron repetidos 02 veces, eligiendo el Método de Franket y Col. para dar mejores resultados en la amplificación, método utilizado por muchos investigadores para extraer ADN de heces.

La estandarización del PCR en muestras de heces fue similar al PCR estandarizado en cepa, variando los pasos de amplificación, un ciclo previo con una Tm a 45°, y luego 35 ciclos restantes con una Tm de 43°C. con la finalidad de aumentar la especificidad de los Cebadores de acoplarse al DNA blanco de *Campylobacter jejuni* presente en la muestra de heces. Reportándose una sensibilidad de los Cebadores para detectar a *Campylobacter jejuni* en heces de 1.5×10^2 bacterias equivalentes a un picogramo de DNA. Lo que difiere enormemente de la sensibilidad del cultivo cuyo límite de detección mínima es de 1.5×10^4 bacterias. Así nuestro PCR detectó menor número de bacterias que el cultivo, que como se sabe muchas veces la infección por *Campylobacter jejuni* requiere solamente de un número bajo de bacterias para producir una infección, lo que sería de mucho provecho para detectar una infección inicial por este microorganismo.

No se evidenciaron reacciones cruzadas de nuestro PCR con otras bacterias causantes de infecciones diarreicas; al probarse con 10 muestras infectadas con diversas bacterias, no detectándose productos de amplificación, lo que comprobó lo realizado por STUCKI y Col. lo que nos hace pensar que el set de Cebadores elegidos en este estudio es digno de confianza al no evidenciar reacciones cruzadas con otras enterobacterias como es el caso de *Campylobacter coli*.

Finalmente se analizaron muestras de heces positivas y negativas a *Campylobacter jejuni* con nuestro PCR y se compararon los resultados con los obtenidos por el

cultivo. De las 33 muestras positivas a cultivo, 29 fueron detectadas por PCR y 05 fueron falsos negativos, lo cual podría deberse a dos razones: primero a las sustancias inhibidoras presentes en las muestras de heces como reportan diversos investigadores; o a la degradación del DNA presente en la muestra de heces por un mal almacenamiento de la misma, ya que el PCR se realizó después de casi 6 meses de recolectada la muestra, desventaja frente al cultivo cuyo análisis se procesó el mismo día de la toma de muestra. De las 56 muestras negativas por cultivo, 47 fueron negativas por PCR y 09 dieron resultados positivos. Estas muestras que dieron resultados positivos podrían estar justo en el rango en el cual el cultivo no es capaz de detectar ($<10^4$ bacteria/g de heces). Una forma de confirmar que no se trata de falsos positivos sería mediante el diseño de una sonda de hibridización construida a partir de la región interna del producto amplificado.

Consideramos que los resultados obtenidos son aceptables, demostrándose que aplicando el método de PCR, podemos lograr un diagnóstico temprano de infección por *Campylobacter jejuni* en menos de 24 horas a diferencia del cultivo que requiere de 4 días como mínimo; mostrando una sensibilidad similar. Lo que ilustra el beneficio del PCR para diagnosticar una infección inicial por *Campylobacter jejuni* en muestras de heces en solo un día de trabajo.

VI. CONCLUSIONES

Las informaciones obtenidas con la realización del presente trabajo nos permiten concluir:

1. La sensibilidad del par de cebadores CAMPYJ1 y CAMPYJ2 reportó un límite de detección de 15 bacterias, equivalente a 100 fentogramos de ADN en cepa pura de *Campylobacter jejuni*.
2. El Método de Franket y Col, es útil, sencillo, fácil de ejecutar y de bajo costo comparado con otros métodos de extracción como el uso de columnas, para la extracción de ADN directamente de Heces.
3. Se logró estandarizar el método de PCR para detectar a *Campylobacter jejuni* directamente de heces, con un límite de detección de 1.5×10^2 bacterias (1 picogramo de ADN), permitiendo la detección de un número bajo de bacterias en heces.
4. El PCR no evidenció reacciones cruzadas con *Campylobacter coli*, *Campylobacter spp.*, *Shiguella spp.*, *Shiguella sonnei*, *Shiguella flexneri*, *Aeromona spp*, *Salmonella (GR B)*, *Samonella (Non Typhi)*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae (Non 01)* presentes en muestras de heces.
5. El PCR logró detectar a *Campylobacter jejuni* en heces después de 6 meses de almacenada la muestra, lo que muestra su utilidad para estudios epidemiológicos posteriores.

6. La prueba del PCR es un método sencillo, rápido y fácil de ejecutar para el Diagnóstico de *Campylobacter jejuni* en Heces con una sensibilidad de 88% y una especificidad de 84%.

VII. RECOMENDACIONES

1. Sería importante diseñar una sonda que pueda hibridizar con el producto amplificado para incrementar la sensibilidad y especificidad del PCR.

2. Se recomienda en estudios posteriores comparar simultáneamente y en las mismas condiciones el Cultivo y PCR para obtener resultados más confiables en cuanto a la sensibilidad.

3. Se recomienda probar e idear otros métodos de extracción de ADN de muestras de heces para obtener un producto mucho más puro como el uso de perlas magnéticas.

4. Sería importante repetir el trabajo incluyendo un número mayor de muestras positivas a otros enteropatógenos para descartar la existencia de reacciones cruzadas, para evitar falsos positivos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Buharia, Oyofe and Thornton et al. Specific detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using Polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2613-19.
2. Buharia, Oyofe and Rollins D. Efficacy of filter types for detecting *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental water samples by Polymerase Chain Reaction *Applied and Environmental Microbiol.* 1993;59:4090-95.
3. Eysers M, Chapelle S, Van G, et al. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by Polymerase chain reaction amplification of 23S Rna gene fragments. *J Clin Microbiol.* 1993;31:3340-43.
4. Gonzales I, Grant K, Richardson O. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *coli* by using a PCR Test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. *J Clin Microbiol.* 1997;35:759-63.
5. Morris G, and Patton Ch. *Campylobacter Manual Clin Microbiol* 4^a Ed Dic;1985.

6. Giesendorf B, Quint W, Henkens M. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. In chicken products by using the polymerase chain reaction. *Ap Environ Microbiol.* 1992;58:3804-08.
7. Grado O, Bravo N, Butzler J: Caso-Control study of identify risk factors for Pediatric *Campylobacter* diarrhea in Lima –Perú. *Bull Who* 1988;66:169-74.
8. Bklack R, Lores de Romana of transmission in Huascar – Perú *Am. J. Epidemiol.* 1989;129:785-99.
9. Marquis G, Ventura G, Gilman R. Fecal contamination of shanty town toddlers in Housholds with non corraled poultry, Lima-Perú. *A J. Of Public Health.*1990;2:146.
10. Korolik V, Coloe P, and Krishnapillai V. A specific DNA probe for the identification of *Campylobacter jejuni*. *J Gral Microbiol.* 1988;134:521-29.
11. Korolik V, Moorthy L, Coloe P. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains by using restriction endonuclease DNA profiles and DNA fragment polymorphisms. *J. Clin Microbiol.* 1995;33:1136-40.21.
12. Lind L, Stogren E, Melby K. DNA fingerpriting and serotyping of *Campylobacter jejuni* isolates from epidemic outbreaks, *J Clin Microbiol.* 1996;34:892-96.
13. Nachamkin I, Bohachick K, and Pattonch. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymotphism analysis. *J Clin Microbiol.*1993;31:1531-36.

14. Blaser M; Taylor P, and Felman R. Epidemiology of Campylobacter jejuni Infections. *Epideol. Rev.* 1983;5:157-76.
15. Nachamkin I, Blaser M. Tompkins L. Campylobacter jejuni Current Status Future Trends, 1992.
16. Winter S , and Slavik M. Evaluation of a PCR based assay for specific detection of Campylobacter jejuni in Chicken washes. *Mol and cel Prob.* 1995;09:307-10.
17. Boom R, Sol C, Salimans M. Rapid and simple method for purification of nucleic Acid. *J Clin Microbiol.* 1990;28:495-503.
18. Breniere S, Bosseno M, Telleria J. Aplication of Polymerase Chain Reaction diagnosis and Strain typing of Ytypanosoma cruzi in Bolivian Triatomines *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53:179-84.
19. Cheng-Hsun Chiu and Jonathan T. Rapid identification of Salmonella serovars in Feces by specific detection of virulance genes, invA and spvC, by an enrichment broth culture multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol.*1996;34:2619-22.
20. Clayton et al. Sensitive detection of Helicobacter pylori by using PCR. *J Clin Microbiol.* 1992;30:192-99.
21. Barrera H, Ortiz R y Col. Reacción en Cadena de la polimerasa. *Ciencia y Desarrollo* 1993.
22. Stuki V, Frey J, Nicolet J. Identificacion of Campylobacter jejuni on the basis of a Species-specific gene that encodes a membrane protein. *J Clin Microbiol.* 1995;33:853-59.

23. Altamirano M , Kelly M, Wong A, et al. Chacterization of ADN for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samplex by Polymerase Chain Reaction. J Clin Microbiol. 1992;30:2173-76.
24. Collins D. and Ross D. Restriccion Endonuclease Analisis of Campylobacter strains with particular reference to Campylobacter fetus ss. Fetus. J Med Microbiol. 1984;18:117-24.
25. Fedorko D, Nelson N, Cartwright Ch. Identification of microsporidia instool specimenes by using PCR and restriccion endonucleases. J Clin Microbiol. 1995.
26. Frankel G, Giron J, Valmassoi J. Multigene amplification: Simultaneous detection o three virulence genes en diarrhoeal stool. Mol Microbiol. 1989;3:1729-34.
27. Frankel G, Riley L, giron J. Deteccion of Shiguella in feces using DNA amplification. J Infec Dis. 1990;161:1252-56.
28. Fuentes I, Rodriguez M, Domingo C, et al. Urine sample used fpr congenital Toxoplasmosis diagnosis by PCR. J Clin Microbiol. 1996;3:2368-71.