

03072

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZACION DE UN FRAGMENTO DE DNA CRIPTICO DE

Campylobacter jejuni

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A E L A L U M N O

VICTOR HUBERTO BUSTAMANTE SANTILLAN

CUERNAVACA, MOR., 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DEL DR. EDMUNDO CALVA MERCADO, DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM, CUERNAVACA, MOR. MEXICO.

ESTE TRABAJO FUE ASESORADO POR EL SIGUIENTE COMITE TUTORIAL:

DR. JOSE LUIS PUENTE GARCIA - TUTOR PRINCIPAL
DR. EDMUNDO CALVA MERCADO - COTUTOR
DR. XAVIER SOBERON MAINERO - COTUTOR
DR. FERNANDO VALLE BAHEZA - COTUTOR

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO, EL AUTOR FUE BECARIO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACyT) Y DEL PROYECTO HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE.

INDICE

| | Página |
|--|--------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 8 |
| III. OBJETIVOS | 10 |
| IV. MATERIALES Y METODOS | 11 |
| V. RESULTADOS | |
| a) Caracterización inicial de las sondas CJ01 y CJ02. | 12 |
| b) Hibridación de las sondas CJ01 y CJ02 con DNA de diferentes cepas de <i>Campylobacter</i> . | 12 |
| c) Clasificación de las cepas de origen clínico de <i>Campylobacter</i> por biotipificación e hibridación diferencial genoma-genoma. | 14 |
| d) Análisis de la caracterización de las cepas de <i>Campylobacter</i> . | 21 |
| e) Obtención y análisis de la secuencia de DNA de la sonda CJ01. | 24 |
| f) PCR con DNA de diferentes cepas de <i>Campylobacter</i> . | 28 |
| VI. DISCUSION | 31 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | 36 |
| VIII. APENDICE | 42 |

INTRODUCCION

El género *Campylobacter* se compone de microorganismos pleomórficos Gram-negativos, siendo bacilos cortos en forma de coma, de espiral, o de alas de gaviota (Smibert, 1984).

Varias de las especies que conforman este género han sido reconocidas como patógenas para humanos y animales. Las especies termotolerantes forman parte de los agentes causales más comunmente encontrados en casos de diarrea en humanos. En países desarrollados, se ha visto que 4 al 15% de estas infecciones, se deben a cepas termotolerantes de *Campylobacter* (Tauxe, 1992). En los países en vías de desarrollo, la frecuencia de aislamiento es del 10-20% del total de casos (Taylor, 1992). En un estudio realizado en una comunidad semi-rural de México, estas especies se aislaron en 14.6% de los casos de diarrea en niños (Calva et al., 1988).

C. jejuni comprende frecuentemente del 95-98% de todas las cepas de *Campylobacter* aisladas en los casos de diarrea en humanos (Karmali et al., 1983; Thompson et al., 1986). Sin embargo, en algunas partes del mundo, *C. coli* ha llegado a comprender hasta el 40% de estos casos (Martin et al., 1988; Dzierzanowska, et al. 1988). Otras especies termotolerantes como *C. lari*, *C. upsaliensis* y *C. hyointestinalis*, comprenden menos del 1% de los casos (Griffiths et al., 1990).

Las cepas de *Campylobacter* son selectivamente aisladas, a partir de las heces de humano, en medios con antibióticos que son

incubados durante 48 horas a 37°C. Para su crecimiento se requiere de una atmósfera microaerofílica, con una concentración de 3-15% de oxígeno y de 3-5% de dióxido de carbono. La identificación primaria consiste en la observación microscópica mediante tinción de Gram y la prueba de oxidasa. Después, las cepas se separan en dos grupos de acuerdo a la reacción de catalasa. Las especies termotolerantes pertenecen al grupo de las catalasa-positivas y se distinguen por su capacidad de crecer a 42°C (Morris et al., 1985).

Las especies de *Campylobacter* son difíciles de distinguir entre sí, debido a que presentan reactividad para pocas pruebas bioquímicas y fisiológicas. La Tabla 1 muestra las principales pruebas convencionales que se utilizan para diferenciar las especies patógenas. La diferenciación de las principales especies termotolerantes patógenas se basa principalmente en dos pruebas, la capacidad de *C. jejuni* de hidrolizar el hipurato y la resistencia de *C. lari* al ácido nalidíxico. Sin embargo, en estudios en los que se ha empleado la hibridación genoma-genoma, se ha demostrado que el 20% de las cepas hipurato-negativas, aisladas en casos de diarrea, son en realidad *C. jejuni* (Totten et al., 1987). Asimismo, se han reportado cepas de *C. jejuni* que presentaron resistencia al ácido nalidíxico, o que fueron catalasa-negativas (Altwegg et al., 1987; Hernández et al., 1991). Además, en un estudio se demostró que algunas de las cepas de *C. jejuni* tienen el mismo biotipo de cepas de *C. coli* (Nicholson et al., 1993).

Así, la diferenciación y tipificación de las especies termotolerantes de *Campylobacter* resulta complicada, si se utilizan

Tabla 1. Principales pruebas convencionales que se utilizan para diferenciar las especies de *Campylobacter*.

| | Crecimiento en 1% de glicina | Hidrólisis del hipurato | Catalasa | Crecimiento | | Susceptibilidad | |
|---------------------------|------------------------------------|-------------------------------|----------|-------------|-------|-----------------|---|
| | | | | a 25° C | 42° C | a AN | C |
| <i>C. jejuni</i> | + | + | + | - | + | S | R |
| <i>C. coli</i> | + | - | + | - | + | S | R |
| <i>C. lari</i> | + | - | + | - | + | R | R |
| <i>C. hyointestinalis</i> | + | - | + | + | + | R | S |
| <i>C. sputorum</i> | + | - | - | - | + | R | S |
| <i>C. upsaliensis</i> | - | - | - | - | + | S | S |
| <i>C. mucosalis</i> | - | - | - | - | + | V | S |
| <i>C. fetus</i> | + | - | + | + | - | R | S |
| <i>C. concisus</i> | - | - | - | - | - | R | U |

AN-Acido nalidíxico, C-Cefalotina, R-Resistente, S-Sensible, V-Variable y U-No reportado.

únicamente pruebas bioquímicas. Una situación similar se ha encontrado con la serotipificación y la tipificación por fagos. Estos métodos no diferencian *C. jejuni* de *C. coli* y, además, presentan problemas de reproducibilidad (Grajewski et al., 1985; Hutchinson et al., 1987).

El advenimiento de nuevas técnicas de biología molecular ha permitido generar herramientas novedosas para la identificación de microorganismos patógenos y, en general, han contribuido al conocimiento básico de los organismos.

La identificación y diferenciación de cepas bacterianas puede hacerse por medio de sondas de DNA, que hibriden específicamente con el DNA del microorganismo deseado. Actualmente, se están desarrollando sondas de DNA para el diagnóstico y estudios epidemiológicos de infecciones bacterianas, como las causadas por *Shigella* spp. (Echeverría et al., 1989; Frankel et al., 1989), *Legionella* spp. (Starnbach et al., 1989), *Salmonella* spp. (Rubin et al., 1989; Scholl et al., 1990), *Mycobacterium* spp. (Hance et al., 1989; Hermans et al., 1990), *E. coli* (Echeverría et al., 1989; Frankel et al., 1989) y varias especies de *Campylobacter* (Korolik et al., 1988; Chevrier et al., 1989; Gebhart et al., 1989; Tenover et al. 1990; Taylor et al., 1990), entre otras.

En varios reportes se ha manifestado la dificultad para obtener sondas de DNA especie-específicas para las cepas termotolerantes de *Campylobacter*. Las sondas que se han reportado como específicas para *C. jejuni* frecuentemente hibridan con *C. coli*, o bien no detectan todas las cepas de *C. jejuni* (Korolik et

al., 1988; Taylor et al., 1990; Stonnet y Guesdon, 1993). Otras de las sondas que se han reportado hibridan con todas las especies termotolerantes, o bien hibridan específicamente con *C. jejuni* y *C. coli* (Tenover et al., 1990; Taylor et al., 1990).

La hibridación genoma-genoma se ha tomado como la técnica de referencia para la clasificación de las cepas de *Campylobacter* (Toten et al., 1987; Lai-king et al., 1987; Ezaki et al., 1988; Chevrier et al., 1989; Nicholson et al., 1990).

El estudio de isoenzimas ("multilocus enzyme electrophoresis"; MEE) y la hibridación tipo "Southern", usando como sonda genes que codifican para rRNA (ribotipificación), se ha utilizado con propósitos taxonómicos en combinación con biotipificación, serotipificación y análisis del patrón genómico de restricción, obteniéndose buenos resultados en los estudios epidemiológicos (Patton et al., 1991). Sin embargo, la aplicación individual de estas técnicas revela un alto grado de diversidad genética en *Campylobacter*. De esta forma, se han observado una gran variedad de tipos electroforéticos para *C. jejuni* y *C. coli* con la técnica de MEE (Aeschbacher et al., 1989); a diferencia, en las especies de *Salmonella* se ha encontrado predominancia de uno o dos tipos electroforéticos (Selander et al., 1990). Asimismo, la ribotipificación ha revelado alto número de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (PLFRs) en cepas pertenecientes a una misma especie (Romaniuk et al., 1987a; Moureau et al., 1989; Wachsmuth et al., 1991). Además, utilizando un sistema de PCR en el que se emplean como iniciadores

oligonucleótidos diseñados al azar (RAPD; "randomly amplified polymorphic DNA"), se ha encontrado heterogeneidad genética aún entre cepas de *C. jejuni* pertenecientes a un mismo serotipo (Mazurier et al., 1992).

Recientemente, se han desarrollado sistemas de PCR para la detección y diferenciación de las especies termotolerantes. En algunos de estos sistemas se utilizan, como iniciadores, oligonucleótidos homólogos a secuencias de los genes 16S rRNA o 23S rRNA, con los cuales se obtiene de manera específica un fragmento de DNA amplificado en todas (Giesendorf et al., 1992) o en cada una de estas especies (Eyers et al., 1993). En otros de estos sistemas se utilizan, como iniciadores, oligonucleótidos homólogos a secuencias que se encuentran repetidas a lo largo del genoma de las bacterias, con los cuales se obtienen un patrón de fragmentos de DNA amplificado diferente en cada especie termotolerante (Giesendorf et al., 1993). En un estudio, en el que se utilizaron oligonucleótidos homólogos a la secuencia de una sonda de DNA que hibrida con *C. jejuni* y *C. coli*, se amplificó específicamente un fragmento de DNA en cepas de *C. jejuni* (Stonnet y Guesdon, 1993).

Existen pocos estudios sobre la biología molecular de *C. jejuni* y *C. coli*, a pesar de que su importancia como bacterias enteropatógenas empezó a ser reconocida hace más de 15 años.

Lo anterior se debe, en parte, a que el análisis genético de *Campylobacter* se dificulta por la falta de métodos de transferencia de genes y transducción generalizada, que permitan hacer mutagénesis en estas bacterias. En algunos estudios se han

manifestado, además, problemas para clonar, mantener y expresar el DNA de *Campylobacter* en *E. coli* (Calva et al., 1989; Taylor, 1992; Tompkins, 1992). Así, se han aislados unos cuantos genes de estas bacterias (Taylor, 1992).

ANTECEDENTES

Dado el interés de nuestro grupo en el aislamiento del gene que codifica para la enterotoxina de *C. jejuni*, en colaboración con el grupo del Dr. Guillermo Ruíz-Palacios del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", se realizó un estudio que tenía como objetivo el detectar y aislar este gene. Para ello, se utilizó como sonda un oligonucleótido homólogo a una región conservada entre los genes que codifican para las enterotoxinas CT de *V. cholerae* y LT de *E. coli*. En experimentos de hibridación tipo "Southern", este oligonucleótido hibridó en una región de aproximadamente 2.1 kb del DNA de *C. jejuni* INN 386 cortado con *HindIII*. Así, con el propósito de aislar esta región del genoma, se construyó una biblioteca de genes en el plásmido pBR327, con fragmentos de DNA de *C. jejuni* INN 386 cortado con *HindIII*, de alrededor de 2.1 kb. Sin embargo, ninguno de los plásmidos recombinantes obtenidos hibridó posteriormente con la sonda (Calva et al. 1989).

Una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio es la de generar sistemas de detección y diagnóstico de bacterias enteropatógenas. Así, se decidió determinar si alguno de los fragmentos de DNA, contenidos en los diferentes plásmidos recombinantes, podría utilizarse como sonda para detectar *C. jejuni*. Para esto, de veinte diferentes plásmidos recombinantes, se seleccionaron dos, que no hibridaron con el DNA de *E. coli* y *Salmonella typhi*. Los plásmidos que se seleccionaron fueron

denominados: pCJ01 y pCJ02. Los fragmentos de DNA de *C. jejuni*, contenidos en ambos plásmidos, fueron de alrededor de 2.1 kb. El presente trabajo describe diferentes aspectos de su caracterización.

OBJETIVOS

Objetivo general.-

Contribuir al desarrollo de herramientas moleculares para la clasificación taxonómica y etiológica de las cepas de *Campylobacter*.

Objetivos específicos.-

- 1.- Determinación de la especificidad de las sondas de DNA CJ01 y CJ02 en cepas de referencia y cepas de origen clínico de *Campylobacter*.
- 2.- Determinación y análisis de la secuencia nucleotídica de la sonda CJ01.

MATERIALES Y METODOS

Los materiales y métodos utilizados en este estudio se encuentran descritos en **Materiales y Métodos** del **Apéndice**.

RESULTADOS

-Caracterización inicial de las sondas CJ01 y CJ02.

En una primera etapa, se observó que ambos fragmentos de DNA, contenidos en los plásmidos pCJ01 (sonda CJ01) y pCJ02 (sonda CJ02), no hibridaron con el DNA de 22 distintos enteropatógenos que pueden ser co-aislados con *C. jejuni* (Bustamante, 1991; **Apéndice**). En experimentos de hibridación con DNA de cepas de referencia de diferentes especies de *Campylobacter*, las dos sondas hibridaron específicamente con *C. jejuni* y *C. coli*. Sin embargo, la intensidad de la señal de hibridación de la sonda CJ01 fué aproximadamente seis veces mayor con el DNA de *C. jejuni* que con el DNA de *C. coli*. Al variar la temperatura de lavado de los filtros de 65 a 75°C, la sonda CJ01 hibridó específicamente con *C. jejuni*, mientras que la sonda CJ02 hibridó con *C. jejuni* y *C. coli* (Fig. 1). Así, estas últimas condiciones de hibridación fueron seleccionadas para evaluar la especificidad de las sondas con un mayor número de cepas de *Campylobacter*.

-Hibridación de las sondas CJ01 y CJ02 con DNA de diferentes cepas de *Campylobacter*.

Las sondas CJ01 y CJ02 se hibridaron mediante la técnica de "slot-blot" (hibridación en rejilla) y "Southern-blot" (hibridación tipo Southern) con DNA de cepas de referencia y cepas de origen

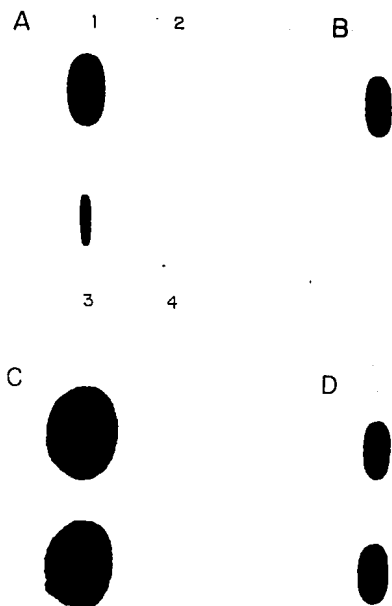


Fig. 1. Hibridación tipo "slot-blot" de las sondas CJ01 (A y B) y CJ02 (C y D) con DNA de cepas de referencia de *Campylobacter*. 1) *C. jejuni* 81116, 2) *C. lari* 83A2878, 3) *C. coli* T2144 y 4) *C. fetus* 85A1944. Las hibridaciones mostradas en los paneles fueron realizadas con un mismo filtro que contenía las muestras del DNA genómico de las cepas.

A) El filtro fue hibridado con la sonda CJ01 y lavado a 65°C.

B) El filtro anterior lavado a 75°C.

El filtro mostrado en A y B fue lavado con SSC 0.1 X - SDS 0.1% hasta eliminar totalmente la marca radioactiva y utilizado en la siguiente hibridación.

C) El filtro fue hibridado con la sonda CJ02 y lavado a 65°C.

D) El filtro anterior lavado a 75°C.

clínico de *Campylobacter* (Figs. 2 y 3).

Como se muestra en la Tabla 2, la sonda CJ01 hibridó específicamente con cuatro de cuatro cepas de referencia de *C. jejuni*, mientras que la sonda CJ02 hibridó con cuatro de cuatro cepas de referencia de *C. jejuni* y con tres de tres cepas de referencia de *C. coli*. Ninguna de las dos sondas hibridó con cepas de referencia de *C. lari* o *C. fetus*.

De una colección de alrededor de 200 cepas de origen clínico, proporcionadas por diferentes grupos (Tabla 3), se seleccionaron 31 para la hibridación con las sondas. Estas cepas fueron aisladas de humanos en tres diferentes regiones geográficas y fueron identificadas originalmente como cepas termotolerantes de *Campylobacter*. La sonda CJ01 hibridó con 21 cepas, lo cual sugería que estas eran *C. jejuni*. La sonda CJ02 hibridó con las mismas cepas y con seis más, lo que sugería que estas últimas eran *C. coli*. Las cuatro cepas restantes no hibridaron con ninguna de las dos sondas, por lo que podrían ser *C. lari* (Tabla 3).

-Clasificación de las cepas de origen clínico de *Campylobacter* por biotipificación e hibridación diferencial genoma-genoma.

Las 31 cepas de origen clínico y las diez cepas de referencia que se usaron en la hibridación con las sondas CJ01 y CJ02, se clasificaron después por biotipificación e hibridación diferencial genoma-genoma.

La biotipificación se evaluó en nuestro laboratorio por medio

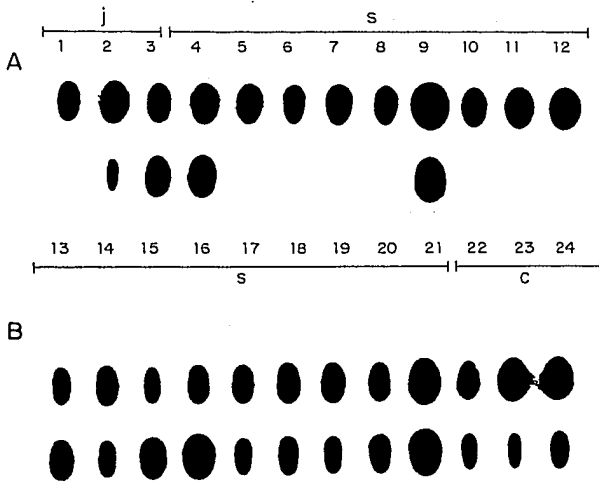


Fig. 2. Hibridación tipo "slot-blot" de las sondas CJ01 (A) y CJ02 (B) con DNA de cepas de referencia de *C. jejuni* (j), *C. coli* (c) y cepas de *Campylobacter* de origen clínico (s). 1) *C. jejuni* INN 386, 2) *C. jejuni* C31, 3) *C. jejuni* S9, 4) NA 264, 5) NA 301, 6) INN 227, 7) NA 240, 8) NA 752, 9) NA 2615, 10) INN 286, 11) NA 685, 12) NA 207, 13) NA 1613, 14) NA 2397, 15) INN 383, 16) NA 256, 17) NA 719, 18) NA 97, 19) INN 209, 20) INN 133, 21) NA 684, 22) *C. coli* T2144, 23) *C. coli* T2232 y 24) *C. coli* INN 183-83.

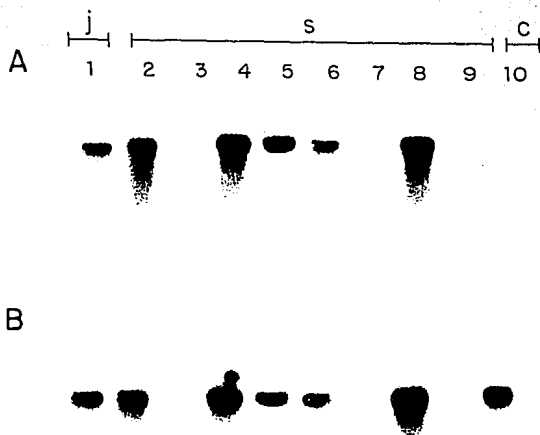


Fig. 3. Hibridación tipo "Southern" de las sondas CJ01 (A) y CJ02 (B) con DNA de cepas de referencia de *C. jejuni* (j), *C. coli* (c) y cepas de *Campylobacter* de origen clínico (s). 1) *C. jejuni* 81116, 2) CRL 11, 3) CRL 14, 4) CRL 15, 5) CRL 16, 6) CRL 17, 7) CRL 20, 8) CRL 21, 9) CRL 22 y 10) *C. coli* T2144.

Tabla 2. Caracterización de cepas de referencia de *Campylobacter*.

| CEPAS | FUENTE ^a | BIOTIPO ^b | GENOTIPO ^c | SONDA CJ01 ^d | SONDA CJ02 ^d |
|---------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>C. jejuni</i> INN 386 | 1 | j | j | + | + |
| <i>C. jejuni</i> 81116 | 2 | j | j | + | + |
| <i>C. jejuni</i> S9 | 2 | j | j | + | + |
| <i>C. jejuni</i> C31 | 2 | j | j | + | + |
| <i>C. coli</i> T2144 | 2 | c | c | - | + |
| <i>C. coli</i> T2232 | 2 | c | c | - | + |
| <i>C. coli</i> INN 183-83 | 1 | c | c | - | + |
| <i>C. lari</i> 83A2878 | 2 | l | * | - | - |
| <i>C. fetus</i> 85A1944 | 2 | f | * | - | - |
| <i>C. fetus</i> INN 783 | 1 | f | * | - | - |

- a. Las cepas fueron obtenidas de: (1) G.M. Ruz-Palacios (Instituto Nacional de la Nutrición, México, D.F.) y (2) L.S. Tompkins (Universidad de Stanford, Stanford, CA., U.S.A.).
- b. Clasificación por biotipificación: *C. jejuni* (j), *C. coli* (c), *C. lari* (l) o *C. fetus* (f).
- c. Hibridación genoma-genoma preferencial con DNA de *C. jejuni* (j) o de *C. coli* (c); (*) significa hibridación débil y no preferencial.
- d. Hibridación positiva (+) o negativa (-) con las sondas CJ01 y CJ02.

Tabla 3. Caracterización de cepas de origen clínico de *Campylobacter*.

| CEPAS | FUENTE ^a | BIOTIPO ^b | GENOTIPO ^c | SONDA CJ01 ^d | SONDA CJ02 ^d |
|---------|---------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| NA 207 | 2 | j | j | + | + |
| NA 240 | 2 | j | j | + | + |
| NA 256 | 2 | j | j | + | + |
| NA 262 | 2 | j | j | + | + |
| NA 301 | 2 | j | j | + | + |
| NA 684 | 2 | j | j | + | + |
| NA 685 | 2 | j | j | + | + |
| NA 752 | 2 | j | j | + | + |
| NA 2397 | 2 | j | j | + | + |
| NA 2615 | 2 | j | j | + | + |
| INN 286 | 1 | j | j | + | + |
| CRL11 | 3 | j | j | + | + |
| CRL12 | 3 | j | j | + | + |
| CRL15 | 3 | j | j | + | + |
| CRL17 | 3 | j | j | + | + |
| CRL21 | 3 | j | j | + | + |
| CRL23 | 3 | j | j | + | + |
| NA 97 | 2 | c | c | - | + |
| NA 719 | 2 | c | c | - | + |
| NA 1613 | 2 | c | c | - | + |
| INN 133 | 1 | c | c | - | + |
| INN 209 | 1 | c | c | - | + |
| INN 252 | 1 | c | c | - | + |
| NA 264 | 2 | c | c | + | + |
| INN 227 | 1 | c | c | + | + |
| INN 383 | 1 | c | c | + | + |
| CRL16 | 3 | c | c | + | + |
| CRL14 | 3 | c | * | - | - |
| CRL18 | 3 | l | * | - | - |
| CRL20 | 3 | l | * | - | - |
| CRL22 | 3 | l | * | - | - |

a. Las cepas fueron obtenidas de: (1) G.M. Ruíz-Palacios (Instituto Nacional de la Nutrición, México, D.F.); (2) L. Sánchez (Centro Regional de la Universidad de Stanford, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México) y (3) C.M. Patton (Centro de Control de Enfermedades, Atlanta, Georgia, U.S.A.).

b. Clasificación por biotipificación: *C. jejuni* (j), *C. coli* (c) o *C. lari* (l).

c. Hibridación genoma-genoma preferencial con DNA de *C. jejuni* (j) o de *C. coli* (c); (*) significa hibridación débil y no preferencial.

d. Hibridación positiva (+) o negativa (-) con las sondas CJ01 y CJ02.

de la prueba del hipurato y resistencia al ácido nalidíxico. Además, las cepas fueron clasificadas con un micrométodo desarrollado por Granados et al. (1994), en el Instituto Nacional de la Nutrición, el cual consiste de las doce pruebas bioquímicas descritas en **Materiales y Métodos** del **Apéndice**. Los resultados obtenidos con ambos criterios de biotipificación fueron los mismos. Así, se identificaron, de entre las cepas de origen clínico, diecisiete como *C. jejuni*, once como *C. coli* y tres como *C. lari* (Tabla 3). La identificación de las cepas de referencia por biotipificación coincidió con lo esperado (Tabla 2).

Para la hibridación diferencial genoma-genoma, utilizamos dos técnicas a las que denominamos: "slot-blot" diferencial y "Southern-blot" diferencial. El principio básico de estas técnicas fué introducido por Totten et al. (1987). Cada cepa fué clasificada de acuerdo a con cual sonda presentaba la mayor intensidad de hibridación.

En la técnica de "slot-blot" diferencial, se usaron primeramente preparaciones de DNA genómico de *C. jejuni* 81116 y de *C. coli* T2144 como sondas radioactivas (ver Fig. 4 del **Apéndice**). Las cepas que se clasificaron como *C. jejuni*, fueron las que mostraron una proporción de hibridación, *C.jejuni/C.coli*, mayor de 1.6. Las cepas identificadas como *C. coli* tuvieron una proporción de hibridación, *C.jejuni/C.coli*, menor de 0.6 (**Apéndice**).

Para descartar la posibilidad de que, al utilizar como sonda el DNA de otras cepas, hubiera variación en los resultados, se utilizaron también preparaciones de DNA genómico de *C. jejuni* S9 y

C. coli INN 183-83 como sondas radioactivas (Fig. 4). La clasificación de las cepas fué idéntica a la obtenida anteriormente.

Un grupo de cepas fueron clasificadas con la técnica de "Southern-blot" diferencial. Esta presentó la ventaja de que, después de la hibridación, se logró eliminar totalmente la marca de los filtros para hibridarlos nuevamente de manera cruzada (Figs. 5 y 6). De esta manera, se descartó la posibilidad de que una señal de hibridación más intensa fuera debida a una mayor cantidad de DNA en el filtro.

Las cepas de origen clínico fueron clasificadas por hibridación genoma-genoma en: diecisiete cepas de *C. jejuni* y diez cepas de *C. coli*. En las cuatro cepas restantes, se presentó una hibridación débil y no preferencial, lo cual sugería que podrían ser cepas de *C. lari* de acuerdo a los resultados previamente obtenidos con las sondas CJ01 y CJ02 y en la biotipificación (Tabla 3). Las cepas de referencia de *C. jejuni* y *C. coli* fueron identificadas de forma precisa con la hibridación genoma-genoma (Tabla 2).

-Análisis de la caracterización de las cepas de *Campylobacter*.

La hibridación genoma-genoma ha sido referida, en varios reportes, como la mejor técnica para la clasificación precisa de las cepas de *Campylobacter* (Totten et al. 1987, Lai-King et al. 1987, Ezaki et al. 1988, Chevrier et al. 1989 y Nicholson et al.

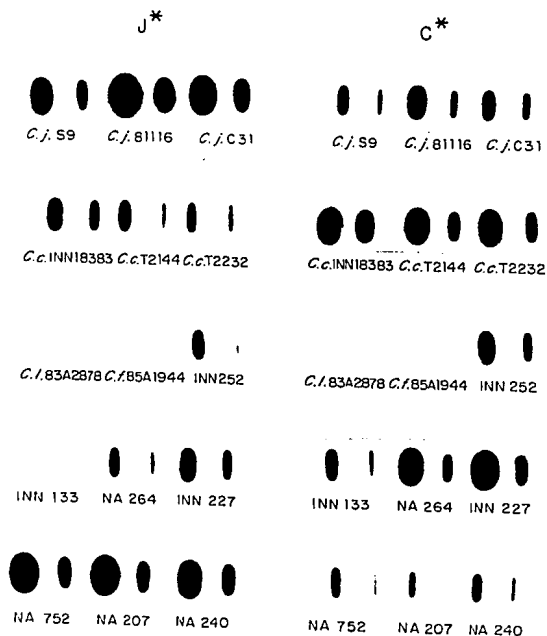


Fig. 4. Hibridación diferencial genoma-genoma. El DNA genómico de *C. jejuni* S9 (J*) o *C. coli* INN 183-83 (C*) se marcó radioactivamente y se hibridó por la técnica de "slot-blot" con DNA genómico de cepas de *Campylobacter* de referencia y de origen clínico.

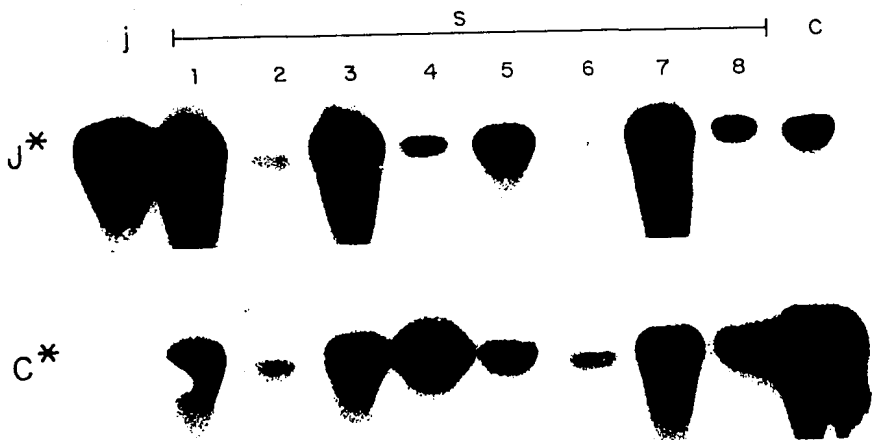


Fig. 5. Hibridación diferencial genoma-genoma. El DNA genómico de *C. jejuni* 81116 (J*) o *C. coli* T2144 (C*) se marcó radioactivamente y se hibridó por la técnica de "Southern" con DNA genómico de cepas de referencia de *C. jejuni* (j), *C. coli* (c) y cepas de *Campylobacter* de origen clínico (s). j) *C. jejuni* 81116 y c) *C. coli* T2144. 1) CRL 11, 2) CRL 14, 3) CRL 15, 4) CRL 16, 5) CRL 17, 6) CRL 20, 7) CRL 21 y 8) CRL 22.

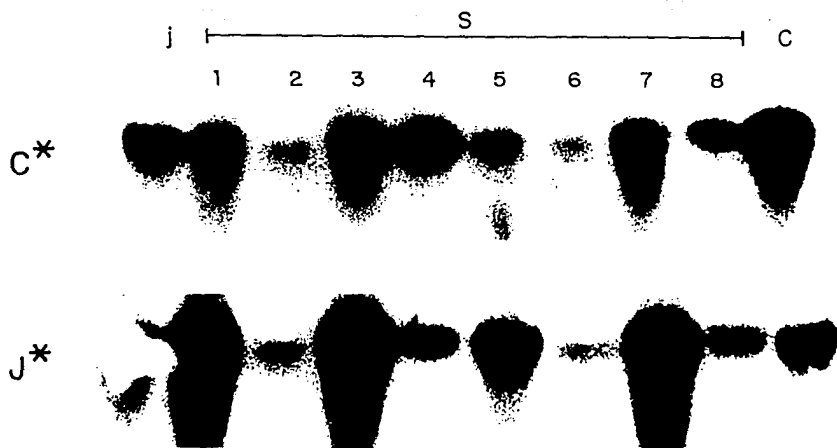


Fig. 6. Hibridación diferencial genoma-genoma. Los filtros que se muestran en la Fig. 5 se lavaron con $0.1 \times \text{SSC}-0.1\% \text{ SDS}$ durante 30 min. a 75°C para eliminar la marca radioactiva y se hibridaron de manera cruzada de como ahí se describe. Es decir, el filtro que se había hibridado con el DNA de *C. jejuni* 81116, se hibridó con el DNA de *C. coli* T2144 y viceversa.

1993). Así, en este estudio tomamos como referencia la clasificación obtenida por esta técnica.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de los diferentes criterios de clasificación, empleados en la caracterización de las diez cepas de referencia. Con cada método se obtuvo la identificación esperada.

En la Tabla 3, se muestran los resultados obtenidos con las 31 cepas de origen clínico. La identificación por biotipificación fue precisa para 30 de las cepas. La cepa CRL 14, que fue identificada erróneamente por este método como *C. coli*, se trata probablemente de una *C. lari* sensible al ácido nalidíxico. De las 27 cepas que hibridaron con la sonda CJ02, diecisiete fueron *C. jejuni* y diez fueron *C. coli*. La sonda CJ01, que detectó específicamente las cepas de referencia de *C. jejuni*, hibridó con las diecisiete cepas que fueron identificadas como *C. jejuni*. Sin embargo, cuatro de las diez cepas que fueron identificadas como *C. coli*, también hibridaron con esta sonda, a saber: NA 264, INN 227, INN 383 y CRL16, mostradas en la Fig. 2, posiciones 4, 6 y 15 y en la Fig. 3, carril 5, respectivamente.

-Obtención y análisis de la secuencia de DNA de la sonda CJ01.

La secuenciación de la sonda CJ01 fué llevada a cabo en ambas direcciones, de acuerdo a la estrategia mostrada en la Fig. 1 del **Apéndice**. La secuencia nucleotídica consistió de 2098 nucleótidos, con un contenido de G+C de 32%, el cual es típico del DNA de

Campylobacter Fig. 7). El análisis de la secuencia nucleotídica reveló dos fases de lectura abierta, las cuales poseen el uso típico de codones de los genes *glyA*, *gyrA*, *lysS*, *flaA* y *tetO* de *C. jejuni* (Chan et al., 1990; Wang et al., 1993; Chan et al., 1992; Fischer et al., 1991; Manavathu et al., 1988).

La primera fase, orf.CJ01.1, se extiende desde el inicio del inserto hasta la posición 1339, sin presentar un codón de inicio. En la posición 197 se encuentra un posible codón de inicio (ATG), sin embargo, la región anterior también tiene el uso típico de codones de *C. jejuni* y no contiene secuencias parecidas a las secuencias consenso de promotores, lo cual apoya que forma parte de esta fase de lectura abierta. Así, la orf.CJ01.1 podría codificar para una proteína de mas de 446 aminoácidos. La segunda fase, orf.CJ01.2, comienza con un ATG en la posición 1684 y se extiende hasta pasado el final del extremo 3'. La región de DNA "corriente arriba" ("upstream") del ATG de inicio de la orf.CJ01.2, contiene un probable sitio de unión de ribosomas y probables secuencias promotoras -10 y -35 parecidas a las consenso para sigma 70 de *E. coli* (TATAAT y TTGACA, respectivamente) y otras parecidas a las consenso para sigma 28 de *B. subtilis* (CCGATAT y CTAAA, respectivamente) (Fig. 7). La mayoría de los genes de *C. jejuni* que se han reportado, contienen secuencias promotoras -10 y -35 parecidas a las consenso para sigma 70 de *E. coli*. Sin embargo, *flaA*, que codifica para una flagelina de *C. coli*, contiene secuencias parecidas a las consenso para sigma 28 (Guerry et al., 1990). En *Bacillus subtilis*, el sigma 28 se utiliza en la expresión

```

orf.CJ01.1
1  AAGCTTGGCTGATTTCTTAAAGTGAAGCTGGAGCTGAATTTTAAAGATGACCAATGAAGCATAGATTTAAAGAAAGGAGCAAGCTATTAAAGAAATA 33
  E L V L L E V E F P Q A R I L V P N H R D Q R E K E K R G D G I E I
021  GCATAGAGCTCTTTAAGCTCTATTATTTTATTTTAAAGCAAGTCCCTTAAATCCGCTGAAAGCTGATATTTCTCTTTATTTTGGAAAGAAAGG 67
  A L O G P I A A A I F F L L E H O P K L A A E E E H F A F I W H N R K A
301  CTCTGGCTTTTATATGGAGATATTTCTGGCACTTTTGGGCAAGTATTTATCTGGTACAGGCTGCTATATCTTTCTTATGCTATTTCTTCTGG 107
  F S F R G C F I A L L C A G T T V G L A G A I A D F V G C H F L A
351  TGGGCTATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 135
  G I F T P Y L E N F E F D E F K N A V D L A S E V M W S S R A L A
401  ATGACAGAGAGCTTATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 147
  I G T A A T A A A G A A G A A G A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
461  TTACTATCAAAAAGAAATGAAGCAAAATATAGACTCTCTTAAAGAAATCTTTATCTTTCTTTATATATATATATATATATATATATATAT 203
  T H O E R W E N T H S L L E S I F I L F M L V V G L F T T
481  TTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 220
  V F I V L D A N L S I Y T O N L F E F V G T L V E V L T G F F V A
501  GGAGCTTGGAGTATATGGAGAGCTCTTGAAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 241
  A C C G T W E G L W D E S E F F E G T G L I G V I E F S E I W L V
581  GAATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 300
  N D B D Q D L K T G W L V G A F P M R G Q V A L L V G C V F G A L
601  GCTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 347
  A I V P V L N L L T Q A Y G F V G A N P A E G M D S T A G A G T T C A G C T T A G A G A C C O C
1001  AAGCAATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 403
  A N L W E F S A G D G F H N I E M G W A P G W E N G I L K I I
1201  TATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 433
  I D N I L K G T O G K E L F P L A V G I G I T I L F P P A K N I L F
1301  ATAGAGCTTAAATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 456
  I A E F L I W A T L D
1401  ACCGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 488
  C T T T A G C T T A A T T A G C A A T T T C A G T A G A G C T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T
1501  AGAGCTTAAATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 518
  A A A A C C C A T T A T C C A T G C T T T C C T T T T A A A T T A C A T T A C A T T A C A T T A C A T T A C A T T
1601  TTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 538
  D I L G I E E G L T E F L F P V S E T G H N I L C T T I L G I D I D
1801  GAGCTTAAAGAAATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 613
  E F F W E S F L I L G E E L L A V I F V W A L L F G G C S D L V
1901  TAAAGCTTACAGAGCTTATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT 654
  K L A V G O F I F T G V I G L I V A K Y L N A L F N G W V V V G M L
2001  CATTTGGGCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 688
  I T G G V V L I L I E L A R R K G G T R I N H L E E I S T F R O A

```

Fig. 7. Secuencia de DNA de la sonda CJ01. La secuencia de aminoácidos deducida de las fases orf.CJ01.1 y orf.CJ01.2, está mostrada debajo de la secuencia nucleotídica. El primer ATG dentro de la orf.CJ01.1 está marcado en negrilla. En la secuencia "corriente arriba" de la orf.CJ01.2, una posible secuencia de unión a ribosomas está subrayada con una línea punteada. Secuencias parecidas a las secuencias consenso de promotores, están subrayadas con una línea (consenso para sigma 70 de *E. coli*) o con doble línea (consenso para sigma 28 de *Bacillus subtilis*). La posición y dirección de los oligonucleótidos utilizados en el ensayo de PCR, están indicadas con una flecha arriba de la secuencia nucleotídica.

de los genes del flagello y genes involucrados en la quimiotaxis (Helmann and Chamberlin, 1988). En experimentos de expresión en minicélulas, no se obtuvo expresión de algún péptido a partir de la sonda CJ01 (Bustamante, 1991), lo cual apoya el hecho de que las dos fases de lectura abierta encontradas estén incompletas.

Los programas FASTA y TFASTA fueron utilizados para determinar si las secuencias de las fases, orf.CJ01.1 y orf.CJ01.2, presentaban homología con alguna(s) de las secuencias reportadas en los bancos de genes y proteínas. En un primer análisis, se comparó la secuencia nucleotídica de las dos fases de lectura abierta con los genes de bacterias de los bancos "GenEMBL" y "GenBank". De esta manera, con algunos genes se obtuvieron homologías hasta de un 60%. Sin embargo, esta se presentó únicamente en regiones menores de 300 nucleótidos para la orf.CJ01.1 y de 100 nucleótidos para la orf.CJ01.2 incluyendo un gran número de "espacios" ("gaps"), haciendo menos significativa la homología. Posteriormente, se comparó la secuencia de aminoácidos deducida de las dos fases de lectura abierta, con las proteínas del banco "SwissProt". Las mayores homologías que se obtuvieron de esta manera, fueron con proteínas de eucariotes y de virus. En general, las homologías fueron menores de 25% y con fragmentos menores de 80 aminoácidos para la orf.CJ01.1 y de 50 aminoácidos para la orf.CJ01.2. La secuencia de aminoácidos deducida de las dos fases de lectura abierta, se comparó también con secuencias de aminoácidos deducidas de los genes de bacterias de los bancos "GenEMBL" y "GenBank". Las homologías que se obtuvieron de esta manera fueron menores de 25%

y con fragmentos menores de 90 aminoácidos para la orf.CJ01.1 y de 50 aminoácidos para la orf.CJ01.2. Algunas secuencias presentaron homologías en fragmentos mayores, sin embargo, estas secuencias de aminoácidos no correspondieron a la fase de lectura abierta real de los genes de los que fueron deducidas. Los resultados descritos anteriormente sugieren que las homologías encontradas fueron obtenidas al azar. Utilizando el programa "motifs", tampoco se encontraron dominios en ninguno de los péptidos, deducidos de las orf.CJ01.1 y orf.CJ01.2, que fueran parecidos a dominios conocidos en diferentes proteínas. Así, con este análisis no se obtuvo de manera evidente una posible identidad de las fases de lectura abierta encontradas en la secuencia nucleotídica de la sonda CJ01.

-PCR con DNA de diferentes cepas de *Campylobacter*.

Un par de oligonucleótidos, VB2 y VB6, diseñados a partir de la secuencia nucleotídica de la sonda CJ01 (su posición está mostrada en la Fig. 7), fueron utilizados como iniciadores en un sistema de PCR (reacción en cadena de la polimerasa; "polymerase chain reaction"). Con este ensayo, se amplificó un fragmento de DNA de 231 pb en cuatro de cuatro cepas de referencia y en cinco de cinco cepas de origen clínico de *C. jejuni* (Fig. 8; líneas 1-9). En dos de dos cepas de referencia y en cinco de seis cepas de origen clínico de *C. coli* (Fig. 8; líneas 10-13), así como en una cepa de referencia y una cepa de origen clínico de *C. lari* (Fig. 8; líneas 18-19), no se obtuvo producto de amplificación. Sin embargo, en una

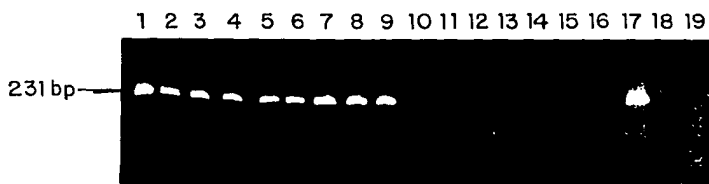


Fig. 8. Productos de PCR del DNA genómico de cepas de *Campylobacter*. 1) *C. jejuni* 81116, 2) *C. jejuni* C31, 3) *C. jejuni* S9, 4) *C. jejuni* INN 386, 5) NA 256, 6) NA 685, 7) NA 2397, 8) CRL11, 9) CRL 23, 10) *C. coli* T2144, 11) *C. coli* T2232, 12) NA 97, 13) INN 209, 14) NA 264, 15) INN 227, 16) INN 383, 17) CRL 16, 18) *C. lari* 83A2878 y 19) CRL 22.

de las cuatro cepas de origen clínico de *C. coli* que hibridaron con la sonda CJ01, si se obtuvo producto de amplificación (Fig. 8; líneas 14-17). Estos resultados sugieren que la secuencia homóloga a la sonda CJ01, presenta variabilidad en las cepas de *C. coli*. Así, este ensayo presentó mayor especificidad para la detección de cepas de *C. jejuni*, que la hibridación con la sonda CJ01.

DISCUSION

Estudios taxonómicos, basados en el análisis del rRNA, han revelado que las especies de *Campylobacter* forman un grupo filogenético distinto de los cinco grupos hasta la fecha propuestos para las bacterias Gram-negativas (Romaniuk et al., 1987b; Vandame et al., 1991). Por otra parte en varios estudios se ha reportado que *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari* son especies diferentes (Thompson III et al., 1988; Vandame et al., 1991; Lai-King et al., 1987; Ezaki et al., 1988) y que los genomas de *C. jejuni* y *C. coli* poseen de 30 a 50% de homología entre si y que ambos tienen alrededor de 10% de homología con el de *C. lari* (Lai-King et al., 1987; Ezaki et al., 1988; Belland et al., 1982). Sin embargo, para la realización de la mayoría de estos estudios solo se han utilizado cepas de referencia.

Debido a que, en general, sólo una característica fenotípica permite la diferenciación entre *C. jejuni* y *C. coli* (hidrólisis del hipurato), y entre éstas y *C. lari* (resistencia al ácido nalidíxico), la identificación de las cepas de campo es poco precisa, siendo que la identidad representa un paso crucial en estudios epidemiológicos. Así, por ejemplo, aunque en algunos lugares se ha reportado una alta incidencia de cepas de *C. coli*, estas podrían ser cepas hipurato-negativas de *C. jejuni*, como ha sido descrito previamente (Totten et al., 1987).

En este trabajo, se evaluó la especificidad de dos sondas de DNA para *Campylobacter*, con el objetivo de determinar si estas

podrían ser utilizadas para la diferenciación de las cepas termotolerantes *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*.

La sonda CJ02 hibridó específicamente con cepas de referencia de *C. jejuni* y *C. coli*. Utilizando cepas de origen clínico, esta sonda hibridó específicamente con las 17 cepas de *C. jejuni* y con las 10 cepas de *C. coli*, las cuales fueron aisladas de 3 diferentes regiones geográficas. Una sonda de DNA con características similares ha sido previamente reportada (Taylor et al., 1990); sin embargo, esta sonda hibrida débilmente con DNA de cepas de *C. lari*. Así, la sonda CJ02 tiene mayor especificidad para *C. jejuni* y *C. coli* que cualquier otra sonda que hasta el momento se haya reportado.

Debido probablemente a la variabilidad genética de las cepas de *C. jejuni* y *C. coli*, se ha dificultado el aislamiento de sondas de DNA que permitan diferenciar estas dos especies. Las sondas que se han reportado como específicas para *C. jejuni* hibridan, aunque con menor intensidad, con DNA de *C. coli*, o bien, no detectan todas las cepas de *C. jejuni* (Korolik et al., 1988; Taylor et al., 1990; Giesendorf et al., 1993). Además, los intentos que se han hecho para aislar sondas específicas para *C. coli* no han tenido éxito (Giesendorf et al., 1993).

La sonda CJ01 hibridó específicamente con cepas de referencia de *C. jejuni*. Las 17 cepas de origen clínico identificadas, mediante otros parámetros, como *C. jejuni*, hibridaron con esta sonda. Sin embargo, 4 de 10 cepas de origen clínico de *C. coli*, aisladas de tres diferentes regiones geográficas, también

hibridaron con la sonda CJ01. Estos resultados revelan la heterogeneidad genética de las cepas de campo de *C. jejuni* y *C. coli*, la cual podría deberse a una posible transferencia de DNA entre estas bacterias. A este respecto, se ha demostrado que la mayoría de las cepas de *C. coli* y en menor frecuencia algunas cepas de *C. jejuni* son naturalmente competentes y que, el proceso de transformación natural de estas cepas es específico, ya que solamente aceptan el DNA de *C. jejuni* o de *C. coli* (Wang et al., 1990; Wassenaar et al., 1993). Por lo anterior podría esperarse que sondas de DNA para una de estas dos especies, hibridaran con el DNA de algunas cepas de la otra especie, como sugieren los resultados obtenidos en este trabajo.

En la mayoría de los estudios epidemiológicos de *Campylobacter*, se reporta a *C. jejuni* y *C. coli* como una sola especie (*C. jejuni/coli*). Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado si ambas especies utilizan el mismo mecanismo de patogenicidad para causar la diarrea. A este respecto, se ha reportado que en países desarrollados, *C. jejuni/coli* produce diarrea tipo inflamatoria, característica de un organismo invasivo (Blaser and Reller, 1981; Blaser et al., 1983), mientras que, en países en desarrollo produce diarrea acuosa similar a la causada por *V. cholerae* (Glass et al., 1983; Ruíz-Palacios et al., 1983). Aún mas, en países en desarrollo se aísla frecuentemente en casos asintomáticos (Calva et al., 1988; Glass et al., 1983; Blaser et al., 1986). A la fecha no se ha estudiado si una misma cepa puede causar los distintos cuadros clínicos, o si estos, son producidos

por diferentes cepas. Así, la realización de estudios que definan si los aislados clínicos pueden agruparse en diferentes categorías o especies, dependiendo de características fenotípicas que consistentemente correlacionen con los diferentes cuadros clínicos, será de gran utilidad para definir si es necesaria la diferenciación de *C. jejuni* de *C. coli*, o si estas pueden referirse como una sola especie la cual, podría dividirse en grupos de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad como en el caso de *E. coli* (*E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteropatógena, etc.) (Levine, M.M., 1987).

En la práctica un posible sistema para la diferenciación de las especies termotolerantes de *Campylobacter*, podría estar basado en la generación, por PCR, de patrones de productos de amplificación específicos para cada una de estas especies. Para lograr esto, se podrían usar como iniciadores, una mezcla de oligonucleótidos con diferentes especificidades para las especies termotolerantes. Pares de oligonucleótidos, diseñados a partir de las secuencias de las sondas CJ01 ó CJ02, podrían ser utilizados en la generación de dichos patrones. Aún más, estos podrían mezclarse con otros oligonucleótidos que se han utilizado para la detección específica por PCR de cada una de las especies termotolerantes (Giesendorf et al., 1992; Eysers et al., 1993). Este tipo de sistema de PCR tendría la ventaja de que podría utilizarse directamente en muestras de heces y permitiría la diferenciación de las especies termotolerantes en una sola reacción.

Uno de los puntos interesantes que surgen de los resultados

anteriores, es el de investigar si los genes parcialmente contenidos en la sonda CJ01 codifican para alguna proteína que pueda conferir propiedades adaptativas y que, por lo tanto se transfiriera con mayor frecuencia de *C. jejuni* a *C. coli* y, a su vez, fuera establemente conservada en *C. jejuni*. De las cepas analizadas, no se encontró ninguna que fuera negativa para la sonda e identificada por biotipo e hibridación genoma-genoma como *C. jejuni*.

En el presente estudio, no se encontró homología alguna entre la secuencia de CJ01 y la secuencia de algún gene o proteína que nos pudiera sugerir una probable identidad de la información genética contenida en este fragmento de DNA. En un estudio paralelo, se encontró que la sonda CJ02 contiene la región central del gene *rpoB* de *C. jejuni*, el cual codifica para la subunidad beta de la RNA polimerasa (**Apéndice**), que en parte explica porque se encuentra más conservada.

El aislamiento de fragmentos de DNA que contengan las fases de lectura abierta completas, permitirá la realización de estudios de expresión y mutágenesis de estos probables genes, para determinar su función en *C. jejuni* y, a su vez, el análisis mas detallado de esta región permitirá definir si se trata, ya sea de una región hipervariable, pero presente en *C. coli* o, de una región móvil que puede ser insertada en el cromosoma.

BIBLIOGRAFIA

1. **Aeschbacher, M., and Piffaretti, J-C.** 1989. Population genetics of human and animal enteric *Campylobacter* strains. *Infect. Immun.* **57**:1432-1437.
2. **Altwegg, M., Burnens, A., Zollinger-Iten, J., and Penner, J.L.** 1987. Problems in identification of *Campylobacter jejuni* associated with acquisition of resistance to nalidixic acid. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1807-1808.
3. **Belland, R.J., and Trust, T.J.** 1982. Deoxyribonucleic acid sequence relatedness between thermophilic members of the genus *Campylobacter*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2515-2422.
4. **Blaser, M.J., and Reller, L.B.** 1981. *Campylobacter* enteritis. *New England J. Med.* **305**:1444-1452.
5. **Blaser, M.J., Wells, J.G., Feldman, R.A., Pollard, R.A., Allen, J.R., and the collaborative diarrheal disease study group.** 1983. *Campylobacter* enteritis in the United States. *Ann. Intn. Med.* **98**:360-365.
6. **Blaser, J.M., Taylor, D.N., and Echeverría, P.** 1986. Immune response to *Campylobacter jejuni* in a rural community in Thailand. *J. Infect. Dis.* **153**:249-254.
7. **Bustamante, V.** 1991. Caracterización y aplicación de una sonda de DNA para *Campylobacter*. *Esc. Nal. de Ciencias Biológicas - IPN.* Tesis de licenciatura.
8. **Calva, E., Torres, J., Vázquez, M., Angeles, V., de la Vega, H., and Ruiz-Palacios, G.M.** 1989. *Campylobacter jejuni* chromosomal sequences that hybridize to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* LT enterotoxin genes. *Gene* **75**:243-251.
9. **Calva, J.J., Ruiz-Palacios, G.M., López-Vidal, A.B., Ramos, A., and Bojalil, R.** 1988. Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in mexican children. *Lancet.* **1**:503-506.
10. **Chan, V.L., and Bingham, H.L.** 1990. Complete sequence of the *Campylobacter jejuni glyA* gene encoding serine hydroxymethyltransferase. *Gene.* **101**:51-58.
11. **Chan, V.L., and Bingham, H.L.** 1992. Lysyl-tRNA synthetase gene of *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **174**:695-701.
12. **Chevrier, D., Larzul, D., Megraud, F., and Guesdon, J.L.** 1989. Identification and classification of *Campylobacter* strains by using nonradioactive DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* **27**:321-326.

13. **Dzierzanowska, D., and Rozynek, E.** Characteristics of the strains of *Campylobacter jejuni/coli* isolated from children in Poland. In: *Campylobacter IV*. Proceedings of the fourth international workshop on *Campylobacter* infections (Kaijser, B., and Falsen, E., eds), pp. 106-107. 1988.
14. **Echeverría, P., Taylor, D.N., Seriwatana, J., Brown, J.E., and Lexomboon, U.** 1989. Examination of colonies and stool blots for detection of enteropathogens by DNA hybridization with eight DNA probes. *J. clin. Microbiol.* **27**:331-334.
15. **Eyers, M., Chapelle, S., Camp, G.V., Goossens, H., and Wachter, R.D.** 1993. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J. Clin. Microbiol.* **31**:3340-3343.
16. **Ezaki, T., Takeuchi, N., Liu, S., Kai, A., Yamamoto, H., and Yabuuchi, E.** 1988. Small-scale DNA preparation for rapid genetic identification of *Campylobacter* species without radioisotope. *Microbiol. Immunol.* **32**:141-150.
17. **Fischer, S.H., and Nachamkin, I.** 1991. Common and variable domains of the flagellin gene, *flaA*, in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **5**:1151-1158.
18. **Frankel, G., Giron, J.A., Valmassoi, J., and Schoolnik, G.K.** 1989. Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrhoeal stool. *Mol. Microbiol.* **3**: 1729-1734.
19. **Gebhart, C.J., Ward, G.E., and Murtaugh, M.P.** 1989. Species-specific cloned DNA probes for the identification of *Campylobacter hyointestinalis*. *J. Clin. Microbiol.* **27**:2717-2723.
20. **Giesendorf, B.A.J., Belkum, A.V., Koeken, A., Stegeman, H., Henkens, M.H.C., Plas, J.V.D., Goossens, H., Niesters, H.G.M., Quint, W.G.V.,** 1993. Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by polymerase chain reaction fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1541-1546.
21. **Giesendorf, B.A.J., Quint, W.G.V., Henkens, M.H.C., Stegeman, H., Huf, F.A., and Niesters, H.G.M.** 1992. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3804-3808.
22. **Glass, R.I., Stoll, B.J., Huq, M.I., Struelens, M.J., Blaser, M.J., and Kibriya, A.K.G.** 1983. Epidemiologic and clinical

- features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* **148**:292-296.
23. **Grajewski, B.A., Kusek, J.W., and Gelfand, H.M.** 1985. Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **22**:13-18.
 24. **Griffiths, P.L., and Park, R.W.A.** 1990. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:281-301.
 25. **Guerry, P., Logan, S.M., Thornton, S., and Trust, T.J.** 1990. Genomic organization and expression of *Campylobacter* flagellin genes. *J. Bacteriol.* **172**:1853-1860.
 26. **Hance, A.J., Grandchamp, B., Levy-Frebault, V., Lecossier, D., Raugier, J., Bocart, D., and Gicquel, B.** 1989. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Mol. Microbiol.* **3**:843-849.
 27. **Helmann, J.D., and Chamberlin, M.J.** 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 839-872.
 28. **Hermans, P.W.M., Schuitema, A.R.J., Soolingen, D.V., Verstynen, C.P.H., Bik, E.M., Thole, J.E.R., Kolk, A.H.J., and Van Embden, A.J.D.** 1990. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1204-1213.
 29. **Hernández, J., Owen R.J., Costas, M., and Lastovica, A.** 1991. DNA-DNA hybridization and analysis of restriction endonuclease and rRNA gene patterns of atypical (catalase-weak/negative) *Campylobacter jejuni* from paediatric blood and faecal cultures. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:71-80
 30. **Hutchinson, D.N., Bolton, F.J., Jones, D.M., Sutcliffe, E.M., and Abbott, J.D.** 1987. Application of three typing schemes (Pener, Lior, Preston) to strains of *Campylobacter* spp. isolated from three outbreaks. *Epidem. Infect.* **98**:139-144.
 31. **Karmali, M.A., Penner, J.L., Fleming, P.C., Williams, A., and Hennessy, J.N.** 1983. The serotype and biotype distribution of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* over a three year period. *J. Infect. Dis.* **147**:243-246.
 32. **Korolik, V., Coloe, P.J., Krishnapillai, V.** 1988. A specific DNA probe for the identification of *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* **134**:521-529.
 33. **Lai-King, N., Stiles, M.E., and Taylor, D.E.** 1987. Classification of *Campylobacter* strains using DNA probes. *Mol.*

Cell. Probes. 1:000-000.

34. **Levine, M.M.** 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**: 377-389.
35. **Manavathu, E.K., Hiratsuka, K., Taylor, D.E.** 1988. Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from *Campylobacter jejuni*. *Gene* **62**:17-26.
36. **Martin, P.M.V., Mathiot, J., Ipero, J., Georges, A.J., and Georges-Courbot, M.C.** 1988. Antibody response to *Campylobacter coli* in children during intestinal infection and carriage. *J. Clin. Microbiol.* **26**:1421-1424.
37. **Mazurier, S., van de Giessen, A., Heuvelman, K., and Wernars, K.** 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**:260-262.
38. **Morris, G.K., and Patton, C.M.** *Campylobacter*. In: Manual of clinical microbiology, fourth edition (Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., and Shadomy, H.J., eds.), pp. 302-308, 1985.
39. **Moureaux, P., Derclaye, I., Gregoire, D., Janssen, M., and Cornelis, G.R.** 1989. *Campylobacter* species identification based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1514-1517.
40. **Nicholson, M.A., and Patton, C.M.** 1993. Application of Lior biotyping by use of genetically identified *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* **31**:3348-3350.
41. **Patton, C.M., Wachsmuth, I.K., Evins, G.M., Kiehlbauch, J.A., Plikaytis, B.D., Troup, N., Tompkins, L., and Lior, H.** 1991. Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* **29**:680-688.
42. **Romaniuk, P.J., and Trust, T.J.** 1987a. Identification of *Campylobacter* species by Southern hybridization of genomic DNA using an oligonucleotide probe for 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:331-335.
43. **Romaniuk, P.J., Zoltowska, B., Trust, T.J., Lane, D.J., Olsen, G.J., Pace, N.R., and Stahl, D.A.** 1987b. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J. Bacteriol.* **169**:2137-2141.
44. **Rubin, F.A., McWhirter, P.D., Punjabi, N.H., Lane, E.D. Sudarmono, P., Pulungshi, S.P., Lesmana, M., Kumala, S.,**

- Kopecko, D.J., and Hoffman, S.L. 1989. Use of a DNA probe to detect *Salmonella typhi* in the blood of patients with fever. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1112-1114.
45. Ruiz-Palacios, G.M., Torres, J., Escamilla, N.I., Ruiz-Palacios, B., and Tamayo, J. 1983. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*: characterization and clinical significance. *Lancet* **ii**:250-253.
46. Scholl, D.R., Kaufmann, C., Jollick, J.D., York, C.K., Goodrum, G.R., and Charache, P. 1990. Clinical application of novel sample processing technology for the identification of *Salmonella* by using DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* **28**:237-241.
47. Selander, R.K., Beltran, P., Smith, N.H., Helmuth, R., Rubin, F.A., Kopecko, D.J., Ferris, K., Tall, B.D., Cravioto, A., and Musser, J.M. 1990. Evolutionary genetic relationships of clones of *Salmonella* serovars that cause human typhoid and other enteric fevers. *Infect. Immun.* **58**:2262-2275.
48. Smibert, R.M. *CAMPYLOBACTER*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1 (Krieg, N.R., and Holt, J.G., eds.), pp. 111-118, 1984.
49. Starnbach, M.N., Falkow, S., and Tompkins, L. 1989. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1257-1261.
50. Stonnet V., and Guesdon J-L. 1993. *Campylobacter jejuni*: specific oligonucleotides and DNA probes for use in polymerase chain reaction-based diagnosis. *FEMS Imm. Med. Microbiol.* **7**: 337-344.
51. Tauxe, R.V. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: *Campylobacter jejuni - Current status and future trends* (Nachamkin, I., Blaser, M.J., and Tompkins, L.S., eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 9-19, 1992.
52. Taylor, D.E., and Hiratsuka, K. 1990. Use of non-radioactive DNA probes for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in stool specimens. *Mol. Cell. Probes.* **4**: 261-271.
53. Taylor, D.E. 1992. Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:35-64.
54. Taylor, D.N. *Campylobacter* infections in developing countries. In: *Campylobacter jejuni - Current status and future trends*

- (Nachamkin, I., Blaser, M.J., and Tompkins, L.S., eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 20-30, 1992.
55. **Tenover, F.C., Carlson, L., Barbagallo, S., and Nachamkin, I.** 1990. DNA probe culture confirmation assay for identification of thermophilic *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1284-1287.
 56. **Thompson, J.S., Cahoon, F.E., and Hodge, D.S.** 1986. Rate of *Campylobacter* spp. isolation in three regions of Ontario, Canada, from 1978 to 1985. *J. Clin. Microbiol.* **24**:876-878.
 57. **Thompson III, L.M., Smibert, R.M., Johnson, J.L., and Krieg, N.R.** 1988. Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:190-200.
 58. **Tompkins, L.S.** Genetic and molecular approach to *Campylobacter* pathogenesis. In *Campylobacter jejuni* - current status and future trends (Nachamkin, I., Blaser, M.J., and Tompkins, L.S., eds.), American society for microbiology. Washington, D.C., pp. 241-254, 1992.
 59. **Totten, P.A., Patton, C.M., Tenover, F.C., Barrett, T.J., Stamm, W.E., Steigerwalt, A.G., Lin, J.Y., Holmes, K.K., and Brenner, D.J.** 1987. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1747-1752.
 60. **Vandamme, P., Falsen, E., Rossau R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., and De Ley, J.** 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**:88-103.
 61. **Wachsmuth, I.K., Kiehlbauch, J.A., Bopp, C.A., Cameron, D.N., Stockbine, N.A., Wells, J.G., and Blake, P.A.** 1991. The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigations of foodborne, diarrheal diseases. *Int. J. Food Microbiol.* **12**:77-90.
 62. **Wang, Y., and Taylor, D.E.** 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. *J. Bacteriol.* **172**:949-955.
 63. **Wang, Y., Huang, W.M., and Taylor, D.E.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:457-463.
 64. **Wassenaar, T.M., Fry, B.N., and van der Zeijst, B.A.M.** 1993. Genetic manipulation of *Campylobacter*: evaluation of natural transformation and electro-transformation. *Gene* **132**:131-135.

A P E N D I C E

(manuscrito en preparación)

TITLE

Assessment of genetic heterogeneity between *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* clinical isolates using the *rpoB* gene and a cryptic DNA sequence from *C. jejuni*.

V.H. BUSTAMANTE, J.L. PUENTE, F. SANCHEZ-LOPEZ, M. BOBADILLA, and
E. CALVA*

Department of Molecular Biology, Instituto de Biotecnología,
Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3
Cuernavaca, Morelos, 62271, México. Fax: (52)(73) 17-2388.

*Corresponding author

Abstract. Several *Campylobacter jejuni* and *C. coli* field isolates, from various geographical origins, were characterized using two *C. jejuni* DNA probes, CJ01 and CJ02. CJ01 hybridized specifically with DNA from *C. jejuni* but not with DNA from *C. coli*, *C. lari*, or *C. fetus* reference strains. Using field isolates, CJ01 hybridized with DNA from all seventeen *C. jejuni* strains. However, four out of ten *C. coli* strains, from different geographical origins, also hybridized with CJ01, indicating genetic heterogeneity. CJ01 contains two incomplete open reading frames (ORFs) that did not demonstrate significant homology with any other known sequences.

CJ02 hybridized specifically with *C. jejuni* and *C. coli* DNA, but not with DNA from *C. lari* and *C. fetus* reference strains or field isolates. CJ02 has an uninterrupted ORF, whose deduced amino acid (aa) sequence showed extensive homology with the central region of the *E. coli* and *S. typhimurium* RpoB proteins (52% and 66% similarity, respectively). The most conserved segments correspond to putative functional domains.

INTRODUCTION

Thermotolerant campylobacter strains are recognized as major etiological agents of human enteritis throughout the world. In developed countries, these strains have been isolated in the stools of 4 to 15% of all patients with diarrheal diseases (Tauxe, R.V., 1992). In developing countries, their isolation rates have ranged from 10 to 20%, in surveys performed in children with diarrhea (Taylor, D.N., 1992).

The two predominant thermotolerant species associated with most human enteritis are *C. jejuni* and *C. coli* (Griffiths et al., 1990). *C. jejuni* frequently comprises about 95 to 98% of all campylobacter isolates from human diarrheal cases (Karmali et al., 1983; and Thompson et al., 1986); although in some instances *C. coli* has amounted to, approximately 40% of these cases (Dzierzanowska et al., 1988; and Martin et al., 1988). *C. lari*, another thermotolerant species, has been recognized as an infrequent but important human enteric pathogen (Tauxe et al., 1985).

The species of campylobacter are difficult to distinguish from each other, because of their lack of reactivity in many conventional biochemical and physiological tests. The differentiation of thermotolerant strains relies on two biochemical tests: the capacity of *C. jejuni* to hydrolyze hippurate, and the resistance of *C. lari* to nalidixic acid. However, Totten et al., (1987), showed that 20% of hippurate-negative strains were in fact

C. jejuni. Other investigators found that some strains of *C. jejuni* were atypical in being resistant to nalidixic acid (Altwegg et al., 1987) or catalase-negative (Hernandez et al., 1991). Furthermore, a study showed that some *C. jejuni* strains have the same biotype of *C. coli* strains, as evaluated by the Lior scheme (Nicholson et al., 1993).

Thus, biotyping frequently provides insufficient resolution for the differentiation of thermotolerant campylobacter species. A similar situation is encountered with serotyping or phage typing, which present problems for discriminating between *C. jejuni* and *C. coli*. There are, in summary, problems of reproducibility with these methods, and in some occasions they provide uninterpretable results (Hutchinson et al., 1987; and Grajewski et al., 1985).

A variety of molecular techniques have been used to identify campylobacter species. Different DNA probes have been used for the specific identification of *C. jejuni* (Taylor et al., 1990; Korolik et al., 1988), *C. jejuni/C. coli* (Taylor et al., 1990) or all thermotolerant strains (Tenover et al., 1990). Recently, PCR assays have been developed for a rapid and sensitive identification of campylobacter strains (Giesendorf et al., 1993; Giesendorf et al., 1992; Eyers et al., 1993). However, problems of low sensitivity or specificity, in the species-specific identification, have been encountered in some of these studies (Taylor et al., 1990; Korolik et al., 1988; Giesendorf et al., 1993). DNA-DNA hybridization, which is the most reliable method to obtain definitive identification, has been used as the reference technique

for classification of campylobacter strains (Totten et al., 1987; Ezaki et al., 1988; Chevrier et al., 1989; Lai-King et al., 1987; and Nicholson et al., 1993).

The combination of other techniques such as restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, multilocus enzyme electrophoresis (MEE), and Southern analysis with rRNA probes (ribotyping), has, not just, revealed a high degree of genetic diversity (Aeschbacher et al., 1989; Wachsmuth et al., 1991; Romaniuk et al., 1987; Moureau et al., 1989), but has, also, proven to be useful when attempting to discriminate among campylobacter strains during epidemiologic evaluations (Patton et al., 1991).

The genetic analysis of campylobacter species presents difficulties when attempting to clone, maintain, and express campylobacter genes in *E. coli* host strains. Thus, only a few genes have been reported, including those coding for: house-keeping functions, the flagellum and resistance to antibiotics (Taylor, D.E., 1992).

Two *C. jejuni* DNA clones, selected at random in our laboratory, from a collection of recombinant plasmids, were tested to see if they allowed the differentiation between *C. jejuni* and *C. coli*; or whether they permitted the grouping of both these species from other campylobacters. The nucleotide sequence of these DNA fragments was determined and compared against other known sequences.

MATERIALS & METHODS

Bacterial strains and growth conditions.

The campylobacter strains used in this study are listed in Tables 1 and 2. All strains were grown on 5% (v/v) defibrinated horse blood agar, for 48-72 h at 37°C, in 7% CO₂. Thermotolerance was evaluated by growth at 42°C.

Strain biotyping.

The strains were characterized by hippurate hidrolysis, evaluated with the rapid tube test, as described by Totten et al., (1987), and susceptibility to 30 µg disks of nalidixic acid was performed according to Derclaye et al., (1989). In addition, they were tested independently with a micromethod developed by Granados et al., (1994). This procedure consisted of tests for hippurate hidrolysis; reduction of nitrate and triphenyl tetrazolium chloride; H₂S production; alkaline phosphatase activity; growth in the presence of glycine or brilliant green; susceptibility to nalidixic acid and cephalotin; and assimilation of propionate, succinate and malate.

Chromosomal DNA extraction.

Chromosomal DNA was extracted and purified essentially as

described by Pitcher et al., (1989), with three exceptions: first, five times larger cell pellets were required for comparable DNA yields; second, after the chloroform-isoamyl alcohol extraction, RNase A was added to a final concentration of 50 µg/ml and the suspension was incubated for 30 min at 4°C; third, after treatment with RNase A, DNA was extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) and chloroform-isoamyl alcohol (24:1). The DNA concentration was determined by espectroscopy, as described by Maniatis et al. (1982); and through comparative densitometry between the sample DNA and a standard phage lambda DNA, on a photograph of an ethidium bromide-stained agarose gel.

Preparation of radioactive probes.

Plasmids pCJ01 and pCJ02 (Férnandez et al., 1991), containing probes CJ01 and CJ02, respectively (Fig.1), were digested with *Hind*III. The DNA fragments obtained were separated by electrophoresis in 1 % agarose gels, and those corresponding to probes CJ01 and CJ02 were purified by the GeneClean assay (Bio 101, La Jolla, Ca., USA). Probes CJ01 and CJ02 were labelled with [α -³²P]dCTP (Amersham, UK, 3, 000 Ci/mmol), at a specific activity of 5 X 10⁸ cpm/µg, by using a random primer extension system kit (DuPont, Boston, USA) as recommended by the manufacturer. Chromosomal DNA of *C. jejuni* and *C. coli* was labelled with [α -³²P]dCTP, at a specific activity of 5 X 10⁶ cpm/µg, by using a nick translation kit (Amersham) following

directions provided by the manufacturer.

Slot-blot hybridization.

A sample of two hundred fifty nanograms of heat-denatured chromosomal DNA, from each strain, were spotted onto nitrocellulose membranes (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, Ca., U.S.A.) using a slot-blot apparatus (Hoefer Scientific Instruments). The filters were then subsequently treated for 1 min with each of the following solutions: 0.2 M NaOH-1.5 M NaCl; 0.4 M Tris/HCl buffer pH 7.4-2 X SSC (1 X SSC is 0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate); and 2 X SSC; and baked for 2 h at 80°C. The membranes were pre-hybridized for 2 h at 42°C in 6 X SSC, 10 X Denhardt solution (1 X Denhardt is 0.02% each of polyvinylpyrrolidone, Ficoll 400 and bovine serum albumin), 100 mM potassium phosphate pH 7.2, and 50 µg of heat-denatured calf thymus DNA per ml. Hybridization was for 16 h at 65°C, in a fresh solution of identical composition containing the labelled DNA probe (6×10^6 cpm). The filters were washed once for 20 min, at 75°C, with 0.1 x SSC-0.1% SDS, and subjected to autoradiography.

For the differential genome-genome slot-blot hybridization, two samples, one of two hundred and the other of fifty nanograms, of chromosomal DNA from each strain were spotted on slots over two nitrocellulose membranes. DNA from *C. jejuni* 81116 and from *C. coli* T2144 were radiolabelled at the same specific activity and both membranes were incubated in parallel, each with one of the two

radiolabelled DNAs, as described above for the slot-blot hybridization. The darkness of the film overlaying each slot was considered to be proportional to the degree of DNA-DNA hybridization between the probe DNA and each strain, since the same hybridization results were obtained in triplicate determinations. Densitometry was done on autoradiograms to quantify the hybridization ratio, (*C. jejuni*/*C. coli*), for each strain.

Southern-blot hybridization.

Fifty nanograms of undigested chromosomal DNA from each strain, were electrophoresed in a 1% agarose gel and transferred onto nitrocellulose membranes by the method of Southern (Southern et al., 1975). The filters were hybridized with probes as described for the slot-blot hybridization, except that the washing temperature was 65°C.

For the differential genome-genome Southern-blot hybridization, two identical Southern blots, containing fifty nanograms of DNA from each strain, were prepared and hybridized as described above, following the same procedure as for the differential slot-blot method.

DNA sequence determination and analysis.

The strategy used to sequence probes CJ01 and CJ02 is shown in Fig.1. The nucleotide sequence was determined by the chain

termination method (Sanger et al., 1977), using the Taq DNA Sequencing Kit (Boehringer, Mannheim, Germany) as recommended by the manufacturer. Plasmids pCJ01 and pCJ02 were purified by alkaline lysis (Maniatis et al., 1982) and used as templates for sequencing reactions. The first reactions were performed using oligonucleotides homologous to the vector as sequencing primers. The derived sequences were used to design oligonucleotide primers, with which to continue the sequencing reactions. Computer-assisted sequence analysis, homology searches and comparisons, were performed with programs from the University of Wisconsin Genetics Computer Group (Madison, Wi., USA) and with the GeneWorks program (IntelliGenetics, Inc., Mountain View, Ca., USA).

PCR.

One hundred nanograms of total DNA from campylobacter reference strains, listed in Table 1, were used as template in a polymerase chain reaction (PCR) assay. Oligonucleotides VB2 (5'-TATAGGAACAGGAGCTATTG-3') and VB6 (5'-CTTAAGTTAGCATCTTCAAC-3'), homologous to the CJ01 sequence (Fig.7), were used as primers in this assay. PCR amplification was performed by using a GeneAmp PCR reagent kit (Perkin Elmer Cetus, Branchburg, New Jersey, USA) with the AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) according to protocols provided by the manufacturer. The PCR involved 30 cycles; consisting of 1 min at 94°C, 50 sec at 55°C and 50 sec at 70°C. PCR products were analyzed by electrophoresis on 6%

polyacrylamide gels, stained with ethidium bromide and photographed.

Nucleotide sequence accession number.

The nucleotide sequence data of CJ01 and CJ02 will appear in the EMBL nucleotide sequence data base under accession number X76062 and X77304, respectively.

RESULTS

Specificity of probes CJ01 and CJ02 to campylobacter reference strains.

Three cryptic DNA fragments were isolated from a size selected *C. jejuni* genomic library (strain INN 386), containing *HindIII* fragments of around 2.1 kb. These showed no hybridization to *Escherichia coli* Q359 nor to *Salmonella typhi* IMSS-1 (Fernández et al., 1991). Two of these fragments were selected at random for further study to investigate their identity and specificity for campylobacter strains. They are named, henceforth, probe CJ01 and CJ02. In order to evaluate their specificity, probes CJ01 and CJ02 were hybridized, by slot-blot or Southern-blot, with DNA from campylobacter reference strains and from different microorganisms likely to be co-isolated with campylobacter. The probes did not

hybridize with DNA from: *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *V. parahemolyticus*, enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *S. typhimurium*, *S. arizona*, *Shigella boydii*, *S. sonnei*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *C. amalonatus*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Morganella morganii*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*; they also did not hybridize to rotavirus RNA and human DNA (data not shown).

CJ02 hybridized specifically with DNA from *C. jejuni* and *C. coli* and not with DNA from *C. lari* or *C. fetus* reference strains (Figs. 2 and 3). CJ01 hybridized specifically with DNA from *C. jejuni* and not with DNA from *C. coli*, *C. lari* or *C. fetus* reference strains (Figs. 2 and 3).

Evaluation of heterogeneity among thermotolerant campylobacter strains.

Heterogeneity in thermotolerant campylobacter strains was evaluated, through the characterization of ten reference strains and thirty one campylobacter field isolates, by hybridization with probes CJ01 and CJ02 (Figs. 2 and 3, and Tables 1 and 2) as well as by biotyping (Tables 1 and 2). The field isolates were from three different geographical origins (Table 2). The standard identification of the strains was performed by differential genome-genome hybridization, a concept originally introduced by Totten et

al., (1987), using either slot-blot (Fig. 4) or Southern blots (Fig. 5). The strains were classified according to their hybridization ratio *C. jejuni*/*C. coli*; this ratio for *C. jejuni* strains was greater than 1.6, and for *C. coli* strains was smaller than 0.6. When DNA of reference strains, other than *C. jejuni* 81116 or *C. coli* T2144, were utilized as probes for genome-genome hybridization, similar ratios were obtained (data not shown).

As shown in Table 1, the identification of campylobacter reference strains by hybridization with CJ01 and CJ02 was compared with the identification of the same strains by biotyping and differential genome-genome hybridization. CJ01 hybridized specifically with four out of four *C. jejuni* reference strains and CJ02 hybridized specifically with four out of four *C. jejuni* reference strains and three out of three *C. coli* reference strains.

As shown in Table 2, the identification of campylobacter field isolates by biotyping correlated with the identification by differential genome-genome hybridization, with one exception: strain CRL14, classified by biotyping as *C. coli*, hybridized weakly with both *C. jejuni* 81116 and *C. coli* T2144 DNA (Fig. 5). CRL14 did not hybridize with CJ02 (Fig. 3); thus, this strain probably is a *C. lari* sensitive to nalidixic acid. CJ02 hybridized with all field isolates identified as *C. jejuni* or *C. coli* and not with those identified as *C. lari* (Table 2). CJ01 hybridized with all field strains, seventeen out of seventeen, identified as *C. jejuni*. However, four out of ten *C. coli* field isolates from three different geographical origins also hybridized with CJ01 (Table 2).

These results revealed genetic heterogeneity among the *C. coli* field isolates.

DNA sequence analysis of CJ01 and CJ02.

Sequencing of CJ01 and CJ02 was carried out from according to the strategy shown in Fig. 1. The sequence analysis of CJ02 revealed a single and continuous open reading frame (ORF), orf.CJ02, of 2082 bp (data not shown), which showed, at the nucleotide level 54% and 58% identity with the *E. coli rpoB* and *S. typhimurium rpoB*, respectively. The *rpoB* gene codes for the RNA polymerase beta subunit and has around 4.1 kb in these bacteria. The predicted protein sequence of orf.CJ02 had 52% and 66% identity with the central region of *E. coli* and *S. typhimurium* beta subunit structures, respectively, with the strongest identity in five regions (Fig. 6), which have been proposed as putative functional domains (Lisitsyn et al., 1988.; and Yepiz-Plascencia et al., 1990).

The wild type amino acids residues that are substituted in RpoB mutants that confer RNA polymerase resistance to the antibiotics rifampicin and streptolydigin are conserved in the predicted polypeptide of orf.CJ02. This polypeptide also contains the conserved box found in the primary structures of some other enzymes participating in DNA metabolism (Fig. 6). These results suggest that CJ02 contains the partial *rpoB* gene of *C. jejuni*.

Sequence of CJ01 showed two partial ORFs (Fig. 7), which have

the typical codon usage for *C. jejuni* genes as compared with *glyA*, *gyrA*, *lysS*, *flaA* and *tetO* (Chan et al., 1990; Wang et al., 1993; Chang et al., 1992; Fischer et al., 1991; and Manavathu et al., 1988).

The first ORF is extended from the beginning of the sequence to position 1339 where a stop codon (TAA) is found. There is an ATG at position 197 as a possible start codon, however, the region upstream from this ATG does not present elements that resemble the regulatory sequences usually present in bacterial promoters including those described for *C. jejuni*. In addition, this upstream portion also shows a typical codon usage for *C. jejuni* genes, supporting that it could extend upstream beyond the terminal portion of the cloned *C. jejuni* DNA fragment. These data suggest that orf.CJ01.1 is a partial ORF, which starts out of CJ01 sequence.

The second ORF, orf.CJ01.2, starts with an ATG at position 1684, following orf.CJ01.1 at a distance of 342 nucleotides. This ORF extends beyond the 3' end of the *C. jejuni* DNA fragment. A putative ribosome binding site (rbs) sequence is located 6 nt from the translation initiation codon. Sequences similar to the sigma 70-type promoter of *E. coli* and sequences typical of the sigma 28-type promoter of *Bacillus subtilis*, are present upstream of the rbs (Fig. 7). The most of *Campylobacter* genes isolated have promoters similar to the sigma 70-type promoter of *E. coli*. However, *flaA*, a flagellin gene of *C. coli*, have a typical sigma 28-type promoter as in *B. subtilis*. Computer analysis of both orf.CJ01.1 and

orf.CJ01.2 did not demonstrate significant homology with any other known sequences.

Identification of *C. jejuni* by PCR.

In order to design a rapid and sensitive species-specific campylobacter test, a PCR assay was developed using as primers oligonucleotides homologous to the nucleotide sequence of orf.CJ01.1 (Fig. 7). The combination of oligonucleotides VB2 and VB6 primed the amplification of a 231-bp fragment in four out of four reference strains and five out of five field isolates of *C. jejuni*. Two out of two reference strains and five out of six field isolates of *C. coli*, as well as one out of one reference strain and one out of one field isolate of *C. lari*, yielded no amplification product. However, strain CRL16, one out of four *C. coli* field isolates that hybridized with CJ01, yielded an amplification product (Fig. 8).

DISCUSSION

Several studies have shown that *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* are distinct species (Thompson III et al., 1988; Vandame et al., 1991; Lai-King et al., 1987; and Ezaki et al., 1988). *C. jejuni* and *C. coli* have 30 to 50% DNA homology between them and both have about 10% DNA homology with *C. lari* (Lai-king et al., 1987; Ezaki et al., 1988; and Belland et al., 1982). The known number of

phenotypic features is limited and the differentiation of these species has been cumbersome by conventional tests. Thus, the precise identification of campylobacter thermotolerant species represents a crucial step in defining their disease spectrum, as well as for epidemiological purposes.

At present, probably because of the close DNA homology between *C. jejuni* and *C. coli* genomes and of the intraspecific genetic variability observed between strains of both species, the isolation of specific DNA probes for each of these species has been difficult. DNA probes for *C. jejuni* have been shown to cross-hybridize with *C. coli* strains (Korolik et al., 1988), or to not detect every strain of *C. jejuni* tested (Giesendorf et al., 1993; Taylor et al., 1990). Attempts to isolate DNA probes specific for *C. coli* have been unsuccessful (Giesendorf et al., 1993).

In the present work, we characterized two campylobacter DNA probes, CJ01 and CJ02, in order to evaluate their usefulness towards the identification of campylobacter species.

CJ02, which partially codes for the *rpoB* gene, hybridized specifically with DNA from *C. jejuni* and *C. coli* reference strains. This probe also allowed the specific identification of field isolates, of these two species, from three different geographical regions. A similar campylobacter DNA probe, specific for *C. jejuni* and *C. coli*, was isolated by Taylor et al., (1990), however, it hybridized weakly to *C. lari* strains. These results are in agreement with other studies, where a higher similarity between *C. jejuni* and *C. coli*, and a lower homology between these species and

C. lari, has been observed (Lai-king et al., 1987; and Ezaki et al. 1988).

CJ01 hybridized specifically with all *C. jejuni* reference strains or field isolates, but not with *C. coli* reference strains. However, four out of ten *C. coli* field isolates, from three different geographical regions, also hybridized with this probe, indicating genetic heterogeneity among them. A separate study demonstrated that most *C. coli*, and some *C. jejuni* strains, are naturally competent during the logarithmic phase of growth (Wang et al., 1990), suggesting that the high genetic variability showed by these two species, could be due to DNA transference between them. Alternatively, it can be envisioned that both species have evolved, to different degrees, from a common ancestor.

Recently, a study showed that PCR-based assays can be successfully applied to the differentiation of thermotolerant campylobacter species (Eyers et al., 1993). We developed a PCR assay for *C. jejuni* using a primer pair homologous to the CJ01 sequence, that amplified all the identified *C. jejuni* strains. However, just one out of four *C. coli* strains, which had hybridized with CJ01, yield an amplification product. These results show that the DNA fragment, that cross-hybridizes to CJ01 in some *C. coli* strains, presents sequence variability between the *C. coli* strains that are positive for this probe. It, also, suggests, that CJ01 is more conserved in *C. jejuni* and that a more detailed analysis of this region has to be performed, in order to identify the right oligonucleotide primers that would be useful to discriminate

between *C. jejuni* strains and *C. coli* strains positive for CJ01, as a way to, develop a really specific test for *C. jejuni*.

The nucleotide sequence of the continuous ORF contained in CJ02 has high homology with the *E. coli* and *S. typhimurium rpoB* genes (54% and 58%, respectively), which code for the RNA polymerase beta subunit. Regions conserved in the beta subunit structures, proposed as putative functional domains, are also conserved in the predicted protein sequence of CJ02. Despite that the *rpoB* gene is highly conserved in the bacterial kingdom, the degree of homology (around 56%) between the *C. jejuni rpoB* gene and other bacterial *rpoB* genes, explains the specificity of CJ02 for *C. jejuni* and *C. coli* in the conditions used in this work. In constrast, the nucleotide sequence of CJ01 did not demonstrate significant homology with any other known sequence, and did not hybridize with any other enteropathogen, suggesting that this region of the *C. jejuni* genoma could code for proteins particular this bacteria.

It will be interesting to see further evaluations of the genetic heterogeneity between *C. jejuni* and *C. coli* isolates from different regions of the world, using either CJ01 and CJ02 or other DNA probes. A better understanding of the molecular taxonomy of campylobacter species shall be of value for studies of pathogenesis, epidemiology and evolution of bacterial species..

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Luz Sánchez, Guillermo M. Ruíz-Palacios, Lucy Tompkins, and Charlotte M. Patton for the gift of strains; Marcos Fernández for excellent technical assistance; Myriam Ortíz for the keeping and handling of the bacterial strains collection; and Paúl Gaytán and Eugenio Bustos for the synthesis of oligonucleotides.

This work was supported by a grant from the Rockefeller Foundation USA (RF 87049#26); a grant from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-IN 204391); and by an International Research Scholar Award (to E.C.) from the Howard Hughes Medical Institute, USA (75191-527102).

REFERENCES

1. **Aeschbacher, M., and J-C. Piffaretti.** 1989. Population genetics of human and animal enteric *Campylobacter* strains. *Infect. Immun.* **57**:1432-1437.
2. **Altwegg, M., A. Burnens, J. Zollinger-Iten, and J. L. Fenner.** 1987. Problems in identification of *Campylobacter jejuni* associated with acquisition of resistance to nalidixic acid. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1807-1808.
3. **Belland, R. J., and T. J. Trust.** 1982. Deoxyribonucleic acid sequence relatedness between thermophilic members of the genus *Campylobacter*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:2515-2422.
4. **Chan, V. L., and H. L. Bingham.** 1990. Complete sequence of the *Campylobacter jejuni glyA* gene encoding serine hydroxymethyltransferase. *Gene.* **101**:51-58.
5. **Chan, V. L., and H. L. Bingham.** 1992. Lysyl-tRNA synthetase gene of *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **174**:695-701.
6. **Chevrier, D., D. Larzul, F. Megraud, and J. L. Guesdon.** 1989. Identification and classification of *Campylobacter* strains by using nonradioactive DNA probes. *J. Clin. Microbiol.* **27**:321-

7. **Derclaye, I., I. Delor, M. Van Bouchaute, P. Moreau, G. Wauters, and G. R. Cornelis.** 1989. Identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by gel electrophoresis of the outer membrane proteins. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1072-1076.
8. **Dzierzanowska, D., and E. Rozynek.** 1988. Characteristics of the strains of *Campylobacter jejuni/coli* isolated from children in Poland, p. 106-107. In Kaijser, B., and Falsen, E., (eds), *Campylobacter IV*. Proceedings of the fourth international workshop on *Campylobacter* infections.
9. **Eyers, M., S. Chapelle, G. V. Camp, H. Goossens, and R. D. Wachter.** 1993. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *J. Clin. Microbiol.* **31**:3340-3343.
10. **Ezaki, T., N. Takeuchi, S. Liu, A. Kai, H. Yamamoto, and E. Yabuuchi.** 1988. Small-scale DNA preparation for rapid genetic identification of *Campylobacter* species without radioisotope. *Microbiol. Immunol.* **32**:141-150.
11. **Fernández, M., J. L. Puente, Y. López-Vidal, G. M. Ruiz-Palacios, and E. Calva.** 1991. Methylation of DNA from *Campylobacter jejuni*: detection of sequences similar to *eltB*

- and *toxB*, p. 162-165. In Ruíz-Palacios, G.M., Calva, E., Ruíz-Palacios, B.R., (eds.), *Campylobacter V. Proceedings of the fifth international workshop on Campylobacter infections*.
12. **Fischer, S.H., and I. Nachamkin.** 1991. Common and variable domains of the flagellin gene, *flaA*, in *Campylobacter jejuni*. *Mol. Microbiol.* **5**:1151-1158.
 13. **Giesendorf, B. A. J., W. G. V. Quint, M. H. C. Henkens, H. Stegeman, F. A. Huf, and H. G. M Niesters.** 1992. Rapid and sensitive detection of *Campylobacter* spp. in chicken products by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3804-3808.
 14. **Giesendorf, B. A. J., A. V. Belkum, A. Koeken, H. Stegeman, M. H. C. Henkens, J. V. D. Plas, H. Goossens, H. G. M. Niesters, and W. G. V. Quint.** 1993. Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* by polymerase chain reaction fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **31**:1541-1546.
 15. **Grajewski, B. A., J. W. Kusek, and H. M. Gelfand.** 1985. Development of a bacteriophage typing system for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* **22**:13-18.
 16. **Granados, M. A., Y. López-Vidal, J. J. Calva, and M. L.**

- Guerrero.** Perfiles bioquímicos de las cepas de *Campylobacter* por el método "Micro Campy". Revista de investigación clínica (México). in press.
17. **Griffiths, P. L., and R. W. A. Park.** 1990. *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *J. Appl. Bacteriol.* **69**:281-301.
 18. **Hernández, J., R. J. Owen, M. Costas, and A. Lastovica.** 1991. DNA-DNA hybridization and analysis of restriction endonuclease and rRNA gene patterns of atypical (catalase-weak/negative) *Campylobacter jejuni* from paediatric blood and faecal cultures. *J. Appl. Bacteriol.* **70**:71-80
 19. **Hutchinson, D. N., F. J. Bolton, D. M. Jones, E. M. Sutcliffe, and J. D. Abbott.** 1987. Application of three typing schemes (Pener, Lior, Preston) to strains of *Campylobacter* spp. isolated from three outbreaks. *Epidem. Infect.* **98**:139-144.
 20. **Karmali, M. A., J. L. Penner, P. C. Fleming, A. Williams, and J. N. Hennessy.** 1983. The serotype and biotype distribution of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* over a three year period. *J. Infect. Dis.* **147**:243-246.
 21. **Korolik, V., P. J. Coloe, and V. Krishnapillai.** 1988. A

- specific DNA probe for the identification of *Campylobacter jejuni*. J. Gen. Microbiol. **134**:521-529.
22. **Lai-King, N., M. E. Stiles, and D. E. Taylor.** 1987. Classification of *Campylobacter* strains using DNA probes. Mol. Cell. Probes. **1**:000-000.
23. **Lisitsyn, N. A., G. S. Monastyrskaya, and E. D. Sverdlov.** 1988. Genes coding for RNA polymerase beta subunit in bacteria. Eur. J. Biochem. **177**:363-369.
24. **Manavathu, E. K., K. Hiratsuka, and D. E. Taylor.** 1988. Nucleotide sequence analysis and expression of a tetracycline-resistance gene from *Campylobacter jejuni*. Gene. **62**:17-26.
25. **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
26. **Martin, P. M. V., J. Mathiot, J. Ipero, A. J. Georges, and M. C. Georges-Courbot.** 1988. Antibody response to *Campylobacter coli* in children during intestinal infection and carriage. J. Clin. Microbiol. **26**:1421-1424.
27. **Moureau, P., I. Derclaye, D. Gregoire, M. Janssen, and G. R. Cornelis.** 1989. *Campylobacter* species identification based

- on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1514-1517.
28. **Nicholson, M. A., and C. M. Patton.** 1993. Application of Lior biotyping by use of genetically identified *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* **31**:3348-3350.
29. **Patton, C. M., I. K. Wachsmuth, G. M. Evins, J. A. Kiehlbauch, B. D. Plikaytis, N. Troup, L. Tompkins, and H. Lior.** 1991. Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic-associated *Campylobacter* strains. *J. Clin. Microbiol.* **29**:680-688.
30. **Pitcher, D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett. Appl. Microbiol.* **8**:151-156.
31. **Romaniuk, P. J., and T. J. Trust.** 1987. Identification of *Campylobacter* species by Southern hybridization of genomic DNA using an oligonucleotide probe for 16S rRNA genes. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:331-335.
32. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
33. **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among

DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-507.

34. **Tauxe, R. V., C. M. Patton, P. Edmonds, T. J. Barrett, D. J. Brenner, and P. A. Blake.** 1985. Illness associated with *Campylobacter laridis*, a newly recognized *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **21**:222-225.
35. **Tauxe, R. V.** 1992. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, p. 9-19. In Nachamkin, I., Blaser, M.J., and Tompkins, L.S., (eds.), *Campylobacter jejuni* - Current status and future trends. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
36. **Taylor, D. E., and K. Hiratsuka.** 1990. Use of non-radioactive DNA probes for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in stool specimens. *Mol. Cell. Probes.* **4**:261-271.
37. **Taylor, D. E.** 1992. Genetics of *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:35-64.
38. **Taylor, D. N.** 1992. *Campylobacter* infections in developing countries, p. 20-30. In Nachamkin, I., Blaser, M.J., and Tompkins, L.S., (eds.), *Campylobacter jejuni* - Current status

and future trends. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

39. **Tenover, F. C., L. Carlson, S. Barbagallo, and I. Nachamkin.** 1990. DNA probe culture confirmation assay for identification of thermophilic *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1284-1287.
40. **Thompson, J. S., F. E. Cahoon, and D. S. Hodge.** 1986. Rate of *Campylobacter* spp. isolation in three regions of Ontario, Canada, from 1978 to 1985. *J. Clin. Microbiol.* **24**:876-878.
41. **Thompson III, L. M., R. M. Smibert, J. L. Johnson, and N. R. Krieg.** 1988. Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**:190-200.
42. **Totten, P. A., C. M. Patton, F. C. Tenover, T. J. Barrett, W. E. Stamm, A. G. Steigerwalt, J. Y. Lin, K. K. Holmes, and D. J. Brenner.** 1987. Prevalence and characterization of hippurate-negative *Campylobacter jejuni* in King County, Washington. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1747-1752.
43. **Vandamme, P., E. Falsen, R. Rossau, B. Hoste, P. Segers, R. Tytgat, and J. De Ley.** 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J.*

Syst. Bacteriol. 41:88-103.

44. **Yepiz-Plascencia, G. M., C. A. Radebaugh, and R. B. Hallick.** 1990. The *Euglena gracilis* chloroplast *rpoB* gene. Novel gene organization and transcription of the RNA polymerase subunit operon. Nucleic Acids Res. 18:1869-1878.
45. **Wachsmuth, I. K., J. A. Kiehlbauch, C. A. Bopp, D. N. Cameron, N. A. Stockbine, J. G. Wells, and P. A. Blake.** 1991. The use of plasmid profiles and nucleic acid probes in epidemiologic investigations of foodborne, diarrheal diseases. Int. J. Food Microbiol. 12:77-90.
46. **Wang, Y., and D. E. Taylor.** 1990. Natural transformation in *Campylobacter* species. J. Bacteriol. 172:949-955.
47. **Wang, Y., W. M. Huang, and D. E. Taylor.** 1993. Cloning and nucleotide sequence of the *Campylobacter jejuni gyrA* gene and characterization of quinolone resistance mutations. Antimicrob. Agents Chemother. 37:457-463.

Figure legends

Fig. 1. Sequencing strategy of *C. jejuni* DNA probes CJ01 and CJ02. Restriction maps are shown of the *C. jejuni* *Hind*III fragments CJ01 (A) and CJ02 (B) (thick lines), cloned in pBR327 (thin lines). The arrows indicate the direction and extent of the sequencing reactions performed with synthetic oligonucleotide primers (filled circles). Restriction sites: D, *Dra*I; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pvu*II; R, *Rsa*I; S, *Sau*3AI; T, *Taq*I and Y, *Sty*I.

Fig. 2. Slot-blot hybridization experiments with probes CJ01 (A) and CJ02 (B) to total genomic DNA from campylobacter reference strains and campylobacter field isolates: 1) *C. jejuni* 81116, 2) *C. jejuni* C31, 3) NA 207, 4) NA 240, 5) NA 752, 6) INN 133, 7) INN 383, 8) NA 301, 9) *C. coli* T2144, 10) *C. coli* T2232, 11) INN 252, 12) NA 719, 13) *C. lari* 83A2878, 14) *C. fetus* 85A1944, 15) NA 264 and 16) INN 227.

Fig. 3. Southern-blot hybridization experiments with probes CJ01 (A) and CJ02 (B) to total genomic DNA from campylobacter reference strains and campylobacter field isolates: 1) *C. jejuni* 81116, 2) CRL 11, 3) CRL 14, 4) CRL 15, 5) CRL 16, 6) CRL 17, 7) CRL 20, 8) CRL 21, 9) CRL 22 and 10) *C. coli* T2144.

Fig. 4. Differential slot-blot hybridization between *C. jejuni* and *C. coli* DNA. Radioactive *C. jejuni* 81116 (J*) or *C. coli* T2144 (C*)

total genomic DNA was hybridized to DNA of campylobacter strains fixed on a slot- blot.

Fig. 5. Differential Southern-blot hybridization between *C. jejuni* and *C. coli* DNA. Radioactive *C. jejuni* 81116 (J*) or *C. coli* T2144 (C*) total genomic DNA was hybridized to DNA of campylobacter strains on a Southern blot. 1) *C. jejuni* 81116, 2) CRL 11, 3) CRL 14, 4) CRL 15, 5) CRL 16, 6) CRL 17, 7) CRL 20, 8) CRL 21, 9) CRL 22 and 10) *C. coli* T2144.

Fig. 6. Alignment of the predicted polypeptide of CJ02 (C.j.) with the central region of the RNA polymerase beta subunit of *E. coli* (E.c.) and *S. typhimurium* (S.t.). The shaded rectangles indicate highly conserved regions. The vertical arrows pointing below and towards the solid bar, mark the amino acids residues that are conserved between enzymes participating in DNA metabolism in prokaryotes. The vertical arrows pointing above, indicate the wild type amino acids residues that are changed in RNA polymerase mutants that confer resistance to the antibiotics rifampicin (positions 516, 526, 531 and 564) and streptolydigin (positions 544 and 545).

Fig. 7. DNA sequence of CJ01. The predicted amino acid sequences of orf.CJ01.1 and orf.CJ01.2 are shown below the nucleotide sequence. The first ATG of orf.CJ01.1 is marked by bold letters. In the region upstream of orf.CJ01.2, a putative ribosome-binding site

(rbs) is underlined by a dotted line. A sigma 70-type promoter of *E. coli* (double underlined) and a sigma 28-type promoter of *Bacillus subtilis* (underlined) are also indicated in this region. The consensus sigma 70 promoter contains the sequence TATAAT at the -10 position and TTGACA at the -35 position. The consensus sigma 28 promoter contains the sequence CCGATAT at the -10 position and CTAAA at the -35 position. The positions and direction of oligonucleotides (VB2 and VB6) used in the PCR assay are indicated by arrows above the nucleotide sequence.

Fig. 8. PCR amplification using primers VB2 and VB6, of DNA from selected *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* strains. 1) *C. jejuni* 81116, 2) *C. jejuni* C31, 3) *C. jejuni* S9, 4) *C. jejuni* INN 386, 5) NA 256, 6) NA 685, 7) NA 2397, 8) CRL11, 9) CRL 23, 10) *C. coli* T2144, 11) *C. coli* T2232, 12) NA 97, 13) INN 209, 14) NA 264, 15) INN 227, 16) INN 383, 17) CRL 16, 18) *C. lari* 83A2878 and 19) CRL 22.

Fig. 1.

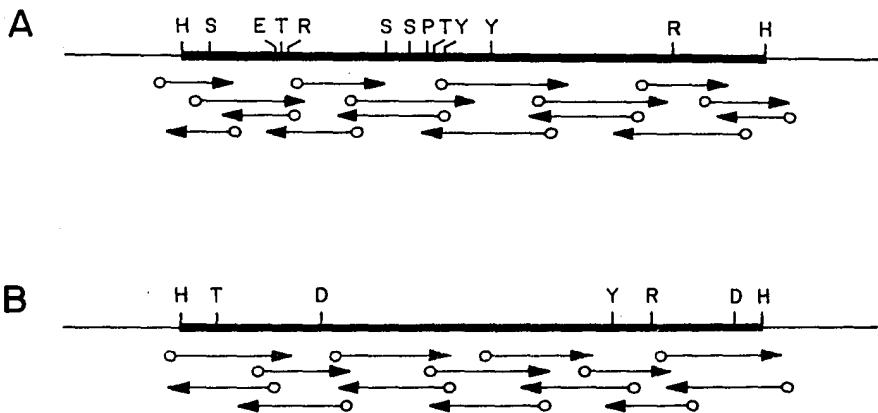


Fig. 2.

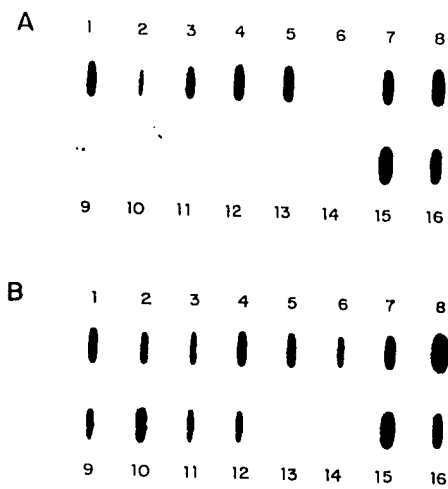


Fig. 3.

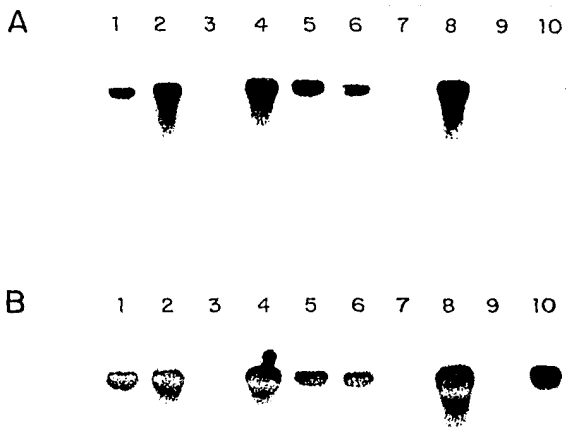


Fig. 4.

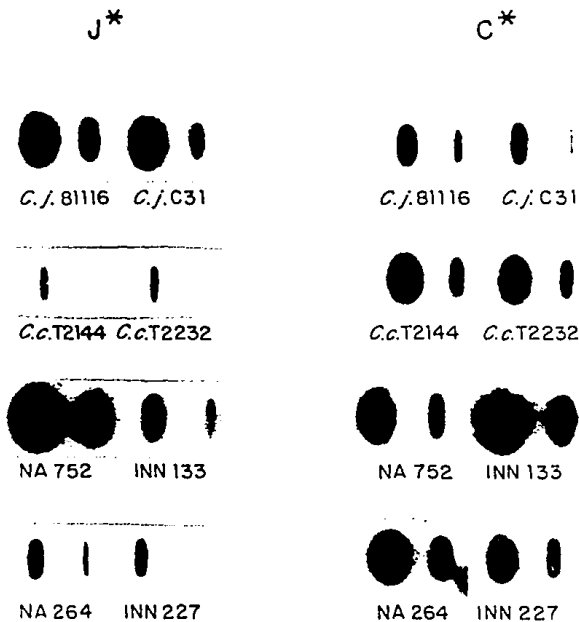


Fig. 5.

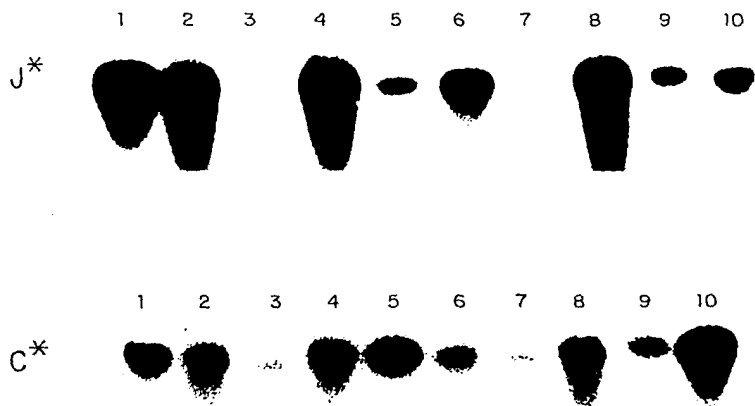


Fig. 7.

ori, C101.1
 1 ACAGTTCCTTCTGAAAGATGACGCGAGGCGCTGAAATTTAAAAATGACCAATGAAAGATGAGAGTGTAAAGAGGAAAAGAAAGGAAAGGCTTAAAGGAAATG
 2 24
 3 25
 4 26
 5 27
 6 28
 7 29
 8 30
 9 31
 10 32
 11 33
 12 34
 13 35
 14 36
 15 37
 16 38
 17 39
 18 40
 19 41
 20 42
 21 43
 22 44
 23 45
 24 46
 25 47
 26 48
 27 49
 28 50
 29 51
 30 52
 31 53
 32 54
 33 55
 34 56
 35 57
 36 58
 37 59
 38 60
 39 61
 40 62
 41 63
 42 64
 43 65
 44 66
 45 67
 46 68
 47 69
 48 70
 49 71
 50 72
 51 73
 52 74
 53 75
 54 76
 55 77
 56 78
 57 79
 58 80
 59 81
 60 82
 61 83
 62 84
 63 85
 64 86
 65 87
 66 88
 67 89
 68 90
 69 91
 70 92
 71 93
 72 94
 73 95
 74 96
 75 97
 76 98
 77 99
 80 100
 81 101
 82 102
 83 103
 84 104
 85 105
 86 106
 87 107
 88 108
 89 109
 90 110
 91 111
 92 112
 93 113
 94 114
 95 115
 96 116
 97 117
 98 118
 99 119
 100 120
 101 121
 102 122
 103 123
 104 124
 105 125
 106 126
 107 127
 108 128
 109 129
 110 130
 111 131
 112 132
 113 133
 114 134
 115 135
 116 136
 117 137
 118 138
 119 139
 120 140
 121 141
 122 142
 123 143
 124 144
 125 145
 126 146
 127 147
 128 148
 129 149
 130 150
 131 151
 132 152
 133 153
 134 154
 135 155
 136 156
 137 157
 138 158
 139 159
 140 160
 141 161
 142 162
 143 163
 144 164
 145 165
 146 166
 147 167
 148 168
 149 169
 150 170
 151 171
 152 172
 153 173
 154 174
 155 175
 156 176
 157 177
 158 178
 159 179
 160 180
 161 181
 162 182
 163 183
 164 184
 165 185
 166 186
 167 187
 168 188
 169 189
 170 190
 171 191
 172 192
 173 193
 174 194
 175 195
 176 196
 177 197
 178 198
 179 199
 180 200
 181 201
 182 202
 183 203
 184 204
 185 205
 186 206
 187 207
 188 208
 189 209
 190 210
 191 211
 192 212
 193 213
 194 214
 195 215
 196 216
 197 217
 198 218
 199 219
 200 220
 201 221
 202 222
 203 223
 204 224
 205 225
 206 226
 207 227
 208 228
 209 229
 210 230
 211 231
 212 232
 213 233
 214 234
 215 235
 216 236
 217 237
 218 238
 219 239
 220 240
 221 241
 222 242
 223 243
 224 244
 225 245
 226 246
 227 247
 228 248
 229 249
 230 250
 231 251
 232 252
 233 253
 234 254
 235 255
 236 256
 237 257
 238 258
 239 259
 240 260
 241 261
 242 262
 243 263
 244 264
 245 265
 246 266
 247 267
 248 268
 249 269
 250 270
 251 271
 252 272
 253 273
 254 274
 255 275
 256 276
 257 277
 258 278
 259 279
 260 280
 261 281
 262 282
 263 283
 264 284
 265 285
 266 286
 267 287
 268 288
 269 289
 270 290
 271 291
 272 292
 273 293
 274 294
 275 295
 276 296
 277 297
 278 298
 279 299
 280 300
 281 301
 282 302
 283 303
 284 304
 285 305
 286 306
 287 307
 288 308
 289 309
 290 310
 291 311
 292 312
 293 313
 294 314
 295 315
 296 316
 297 317
 298 318
 299 319
 300 320
 301 321
 302 322
 303 323
 304 324
 305 325
 306 326
 307 327
 308 328
 309 329
 310 330
 311 331
 312 332
 313 333
 314 334
 315 335
 316 336
 317 337
 318 338
 319 339
 320 340
 321 341
 322 342
 323 343
 324 344
 325 345
 326 346
 327 347
 328 348
 329 349
 330 350
 331 351
 332 352
 333 353
 334 354
 335 355
 336 356
 337 357
 338 358
 339 359
 340 360
 341 361
 342 362
 343 363
 344 364
 345 365
 346 366
 347 367
 348 368
 349 369
 350 370
 351 371
 352 372
 353 373
 354 374
 355 375
 356 376
 357 377
 358 378
 359 379
 360 380
 361 381
 362 382
 363 383
 364 384
 365 385
 366 386
 367 387
 368 388
 369 389
 370 390
 371 391
 372 392
 373 393
 374 394
 375 395
 376 396
 377 397
 378 398
 379 399
 380 400
 381 401
 382 402
 383 403
 384 404
 385 405
 386 406
 387 407
 388 408
 389 409
 390 410
 391 411
 392 412
 393 413
 394 414
 395 415
 396 416
 397 417
 398 418
 399 419
 400 420
 401 421
 402 422
 403 423
 404 424
 405 425
 406 426
 407 427
 408 428
 409 429
 410 430
 411 431
 412 432
 413 433
 414 434
 415 435
 416 436
 417 437
 418 438
 419 439
 420 440
 421 441
 422 442
 423 443
 424 444
 425 445
 426 446
 427 447
 428 448
 429 449
 430 450
 431 451
 432 452
 433 453
 434 454
 435 455
 436 456
 437 457
 438 458
 439 459
 440 460
 441 461
 442 462
 443 463
 444 464
 445 465
 446 466
 447 467
 448 468
 449 469
 450 470
 451 471
 452 472
 453 473
 454 474
 455 475
 456 476
 457 477
 458 478
 459 479
 460 480
 461 481
 462 482
 463 483
 464 484
 465 485
 466 486
 467 487
 468 488
 469 489
 470 490
 471 491
 472 492
 473 493
 474 494
 475 495
 476 496
 477 497
 478 498
 479 499
 480 500
 481 501
 482 502
 483 503
 484 504
 485 505
 486 506
 487 507
 488 508
 489 509
 490 510
 491 511
 492 512
 493 513
 494 514
 495 515
 496 516
 497 517
 498 518
 499 519
 500 520
 501 521
 502 522
 503 523
 504 524
 505 525
 506 526
 507 527
 508 528
 509 529
 510 530
 511 531
 512 532
 513 533
 514 534
 515 535
 516 536
 517 537
 518 538
 519 539
 520 540
 521 541
 522 542
 523 543
 524 544
 525 545
 526 546
 527 547
 528 548
 529 549
 530 550
 531 551
 532 552
 533 553
 534 554
 535 555
 536 556
 537 557
 538 558
 539 559
 540 560
 541 561
 542 562
 543 563
 544 564
 545 565
 546 566
 547 567
 548 568
 549 569
 550 570
 551 571
 552 572
 553 573
 554 574
 555 575
 556 576
 557 577
 558 578
 559 579
 560 580
 561 581
 562 582
 563 583
 564 584
 565 585
 566 586
 567 587
 568 588
 569 589
 570 590
 571 591
 572 592
 573 593
 574 594
 575 595
 576 596
 577 597
 578 598
 579 599
 580 600
 581 601
 582 602
 583 603
 584 604
 585 605
 586 606
 587 607
 588 608
 589 609
 590 610
 591 611
 592 612
 593 613
 594 614
 595 615
 596 616
 597 617
 598 618
 599 619
 600 620
 601 621
 602 622
 603 623
 604 624
 605 625
 606 626
 607 627
 608 628
 609 629
 610 630
 611 631
 612 632
 613 633
 614 634
 615 635
 616 636
 617 637
 618 638
 619 639
 620 640
 621 641
 622 642
 623 643
 624 644
 625 645
 626 646
 627 647
 628 648
 629 649
 630 650
 631 651
 632 652
 633 653
 634 654
 635 655
 636 656
 637 657
 638 658
 639 659
 640 660
 641 661
 642 662
 643 663
 644 664
 645 665
 646 666
 647 667
 648 668
 649 669
 650 670
 651 671
 652 672
 653 673
 654 674
 655 675
 656 676
 657 677
 658 678
 659 679
 660 680
 661 681
 662 682
 663 683
 664 684
 665 685
 666 686
 667 687
 668 688
 669 689
 670 690
 671 691
 672 692
 673 693
 674 694
 675 695
 676 696
 677 697
 678 698
 679 699
 680 700
 681 701
 682 702
 683 703
 684 704
 685 705
 686 706
 687 707
 688 708
 689 709
 690 710
 691 711
 692 712
 693 713
 694 714
 695 715
 696 716
 697 717
 698 718
 699 719
 700 720
 701 721
 702 722
 703 723
 704 724
 705 725
 706 726
 707 727
 708 728
 709 729
 710 730
 711 731
 712 732
 713 733
 714 734
 715 735
 716 736
 717 737
 718 738
 719 739
 720 740
 721 741
 722 742
 723 743
 724 744
 725 745
 726 746
 727 747
 728 748
 729 749
 730 750
 731 751
 732 752
 733 753
 734 754
 735 755
 736 756
 737 757
 738 758
 739 759
 740 760
 741 761
 742 762
 743 763
 744 764
 745 765
 746 766
 747 767
 748 768
 749 769
 750 770
 751 771
 752 772
 753 773
 754 774
 755 775
 756 776
 757 777
 758 778
 759 779
 760 780
 761 781
 762 782
 763 783
 764 784
 765 785
 766 786
 767 787
 768 788
 769 789
 770 790
 771 791
 772 792
 773 793
 774 794
 775 795
 776 796
 777 797
 778 798
 779 799
 780 800
 781 801
 782 802
 783 803
 784 804
 785 805
 786 806
 787 807
 788 808
 789 809
 790 810
 791 811
 792 812
 793 813
 794 814
 795 815
 796 816
 797 817
 798 818
 799 819
 800 820
 801 821
 802 822
 803 823
 804 824
 805 825
 806 826
 807 827
 808 828
 809 829
 810 830
 811 831
 812 832
 813 833
 814 834
 815 835
 816 836
 817 837
 818 838
 819 839
 820 840
 821 841
 822 842
 823 843
 824 844
 825 845
 826 846
 827 847
 828 848
 829 849
 830 850
 831 851
 832 852
 833 853
 834 854
 835 855
 836 856
 837 857
 838 858
 839 859
 840 860
 841 861
 842 862
 843 863
 844 864
 845 865
 846 866
 847 867
 848 868
 849 869
 850 870
 851 871
 852 872
 853 873
 854 874
 855 875
 856 876
 857 877
 858 878
 859 879
 860 880
 861 881
 862 882
 863 883
 864 884
 865 885
 866 886
 867 887
 868 888
 869 889
 870 890
 871 891
 872 892
 873 893
 874 894
 875 895
 876 896
 877 897
 878 898
 879 899
 880 900
 881 901
 882 902
 883 903
 884 904
 885 905
 886 906
 887 907
 888 908
 889 909
 890 910
 891 911
 892 912
 893 913
 894 914
 895 915
 896 916
 897 917
 898 918
 899 919
 900 920
 901 921
 902 922
 903 923
 904 924
 905 925
 906 926
 907 927
 908 928
 909 929
 910 930
 911 931
 912 932
 913 933
 914 934
 915 935
 916 936
 917 937
 918 938
 919 939
 920 940
 921 941
 922 942
 923 943
 924 944
 925 945
 926 946
 927 947
 928 948
 929 949
 930 950
 931 951
 932 952
 933 953
 934 954
 935 955
 936 956
 937 957
 938 958
 939 959
 940 960
 941 961
 942 962
 943 963
 944 964
 945 965
 946 966
 947 967
 948 968
 949 969
 950 970
 951 971
 952 972
 953 973
 954 974
 955 975
 956 976
 957 977
 958 978
 959 979
 960 980
 961 981
 962 982
 963 983
 964 984
 965 985
 966 986
 967 987
 968 988
 969 989
 970 990
 971 991
 972 992
 973 993
 974 994
 975 995
 976 996
 977 997
 978 998
 979 999
 980 1000
 981 1001
 982 1002
 983 1003
 984 1004
 985 1005
 986 1006
 987 1007
 988 1008
 989 1009
 990 1010
 991 1011
 992 1012
 993 1013
 994 1014
 995 1015
 996 1016
 997 1017
 998 1018
 999 1019
 1000 1020
 1001 1021
 1002 1022
 1003 1023
 1004 1024
 1005 1025
 1006 1026
 1007 1027
 1008 1028
 1009 1029
 1010 1030
 1011 1031
 1012 1032
 1013 1033
 1014 1034
 1015 1035
 1016 1036
 1017 1037
 1018 1038
 1019 1039
 1020 1040
 1021 1041
 1022 1042
 1023 1043
 1024 1044
 1025 1045
 1026 1046
 1027 104

Fig. 8.

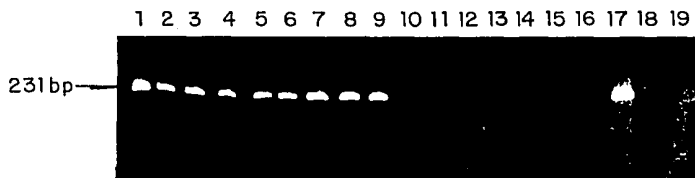


Table 1. Characterization of campylobacter reference strains.

| REFERENCE STRAINS | SOURCE ^a | BIOTYPE ^b | GENOTYPE ^c | PROBE CJ01 ^d | PROBE CJ02 ^d |
|---------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>C. jejuni</i> INN 386 | 1 | j | j | + | + |
| <i>C. jejuni</i> 81116 | 2 | j | j | + | + |
| <i>C. jejuni</i> S9 | 2 | j | j | + | + |
| <i>C. jejuni</i> C31 | 2 | j | j | + | + |
| <i>C. coli</i> T2144 | 2 | c | c | - | + |
| <i>C. coli</i> T2232 | 2 | c | c | - | + |
| <i>C. coli</i> INN 183-83 | 1 | c | c | - | + |
| <i>C. lari</i> 83A2878 | 2 | l | * | - | - |
| <i>C. fetus</i> 85A1944 | 2 | f | * | - | - |
| <i>C. fetus</i> INN 783 | 1 | f | * | - | - |

a. Strains were obtained from: (1) G.M. Ruíz-Palacios (Instituto Nacional de la Nutrición, México, D.F.) and (2) L.S. Tompkins (University of Stanford, Stanford, CA., U.S.A.).

b. Classification by biotype: *C. jejuni* (j), *C. coli* (c), *C. lari* (l) or *C. fetus* (f).

c. Preferential genome-genome hybridization with either *C. jejuni* (j) or *C. coli* (c) DNA; (*) denotes weak and non-preferential hybridization.

d. Positive (+) or negative (-) hybridization, either with probe CJ01 or with probe CJ02.

Table 2. Characterization of campylobacter field isolates

| FIELD ISOLATES | SOURCE ^a | BIOTYPE ^b | GENOTYPE ^c | PROBE CJ01 ^d | PROBE CJ02 ^d |
|----------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| NA 207 | 2 | j | j | + | + |
| NA 240 | 2 | j | j | + | + |
| NA 256 | 2 | j | j | + | + |
| NA 262 | 2 | j | j | + | + |
| NA 301 | 2 | j | j | + | + |
| NA 684 | 2 | j | j | + | + |
| NA 685 | 2 | j | j | + | + |
| NA 752 | 2 | j | j | + | + |
| NA 2397 | 2 | j | j | + | + |
| NA 2615 | 2 | j | j | + | + |
| INN 286 | 1 | j | j | + | + |
| CRL11 | 3 | j | j | + | + |
| CRL12 | 3 | j | j | + | + |
| CRL15 | 3 | j | j | + | + |
| CRL17 | 3 | j | j | + | + |
| CRL21 | 3 | j | j | + | + |
| CRL23 | 3 | j | j | + | + |
| NA 97 | 2 | c | c | - | + |
| NA 719 | 2 | c | c | - | + |
| NA 1613 | 2 | c | c | - | + |
| INN 133 | 1 | c | c | - | + |
| INN 209 | 1 | c | c | - | + |
| INN 252 | 1 | c | c | - | + |
| NA 264 | 2 | c | c | + | + |
| INN 227 | 1 | c | c | + | + |
| INN 383 | 1 | c | c | + | + |
| CRL16 | 3 | c | c | + | + |
| CRL14 | 3 | c | * | - | - |
| CRL18 | 3 | l | * | - | - |
| CRL20 | 3 | l | * | - | - |
| CRL22 | 3 | l | * | - | - |

- a. Strains were obtained from: (1) G.M. Rufz-Palacios (Instituto Nacional de la Nutrición, México, D.F.); (2) L. Sánchez (Stanford Center-Chiapas, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México) and (3) C.M. Patton (Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A.).
- b. Classification by biotype: *C. jejuni* (j), *C. coli* (c) or *C. lari* (l).
- c. Preferential genome-genome hybridization with either *C. jejuni* (j) or *C. coli* (c) DNA; (*) denotes weak and non-preferential hybridization.
- d. Positive (+) or negative (-) hybridization, either with probe CJ01 or with probe CJ02.