



Detecção de *Campylobacter jejuni* em produtos de frango utilizando separação imunomagnética

[Detection of *Campylobacter jejuni* in chicken products using immunomagnetic separation]

T.S. Tejada¹, R.C.S. Conceição², C.D. Timm^{2*}

¹Aluna de pós-graduação – Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, RS

²Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, RS

RESUMO

Campylobacter jejuni é o principal causador de gastroenterite bacteriana aguda, e a carne de frango tem se mostrado uma importante fonte de transmissão. Este microrganismo é de difícil isolamento e os métodos convencionais muitas vezes não são eficientes, podendo levar a resultados errôneos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar a técnica de separação imunomagnética (IMS) na detecção de *C. jejuni* em produtos de frango. Micropartículas magnéticas ligadas a anticorpos policlonais anti-*C. jejuni* foram utilizadas para concentrar *C. jejuni* antes da semeadura em ágar. O protocolo foi comparado com o método convencional. *C. jejuni* foi recuperado do alimento experimentalmente contaminado por ambos os métodos, entretanto, quando foi usada a IMS, a presença de microrganismos contaminantes nos meios de cultura foi menor. *C. jejuni* foi isolado de 7% das amostras de alimento naturalmente contaminadas, usando IMS, e de 3% pelo método convencional. *C. coli* foi isolado de uma amostra pelo método convencional, mas não foi detectado pelo protocolo com IMS. A técnica de IMS pode ser usada para isolamento de *C. jejuni* de alimentos, oferecendo a vantagem de detectar em amostras o microrganismo cujo isolamento não é obtido por meio do método convencional.

Palavras-chave: campilobacteriose, saúde pública, alimento seguro, gastroenterite bacteriana

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is the main cause of acute bacterial gastroenteritis and chicken meat has shown to be an important source of infection. This microorganism is difficult to isolate and the conventional methods are often inefficient and may lead to erroneous results. This study aimed at developing and testing the technique of immunomagnetic separation (IMS) in the detection of *C. jejuni* in chicken products. Microparticles magnetically connected anti-*C. jejuni* polyclonal antibodies were used to concentrate *C. jejuni* before agar seeding. The protocol was compared with the conventional method. *C. jejuni* was recovered from experimentally contaminated food for both methods, however, when the IMS was used, the presence of contaminating microorganisms in the means of culture was smaller. *C. jejuni* was isolated from 7% of samples of food naturally contaminated, using IMS, and 3% by conventional method. *C. coli* was isolated from a sample by conventional method, but it was not detected by protocol with IMS. The IMS technique can be used for isolation of *C. jejuni* in food, offering the advantage of detecting the microorganism in samples from which the isolation is not obtained with the use of the conventional method.

Keywords: campylobacteriosis, public health, food safety, bacterial gastroenteritis

INTRODUÇÃO

Campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial que cursa com diarreia, cólicas, dor abdominal, náuseas e vômitos. *Campylobacter* termotolerantes, particularmente

C. jejuni e, em menor grau, *C. coli*, são a principal causa de infecções gastrointestinais no mundo (Donisson e Ross, 2014). Em países não desenvolvidos, como o Brasil, existem poucos dados da incidência da doença, o que se deve ao reduzido número de pesquisas e notificações de casos e surtos (Silva *et al.*, 2016).

Recebido em 20 de abril de 2017

Aceito em 29 de dezembro de 2018

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: timm@ufpel.tche.br

O principal reservatório de *Campylobacter* são as aves domésticas, embora elas raramente apresentem sinais clínicos da doença, mas outros animais, incluindo bovinos e suínos, também são importantes fontes de transmissão (Donisson e Ross, 2014). Na indústria, durante o processamento dos frangos, pode haver contaminação para a carne e subprodutos devido à presença da bactéria nos intestinos, na pele e nas penas dos animais, ou mesmo de outras fontes, como utensílios e mãos dos manipuladores. *Campylobacter* pode ser encontrado em diversos pontos dentro da linha de abate, com isso, lotes livres de contaminação inicial podem se contaminar durante o processamento, mesmo que tenham sido abatidos em dias subsequentes (Perko-Mäkelä et al., 2011).

As técnicas convencionais de isolamento, além de serem trabalhosas, exigem vários dias de análise e, muitas vezes, a presença de microbiota competitiva inibe o crescimento de *Campylobacter*, podendo levar a resultados errôneos (Theophilo e Jakabi, 2008). Diferentes métodos, como imunoenaios (Pellegrin et al., 2011) e técnicas moleculares (Andrade et al., 2010), têm sido desenvolvidas a fim de abreviar o tempo de detecção e aumentar a sensibilidade e a especificidade no isolamento de *Campylobacter* de alimentos. A separação imunomagnética (IMS) é uma técnica que tem sido proposta para substituir ou melhorar a eficácia de métodos convencionais de isolamento de diversos microrganismos (Cudjoe et al., 1995; Yu et al., 2001; Tram et al., 2012). A IMS consiste no uso de microesferas de poliestireno magnetizadas, revestidas com anticorpos específicos que servem para concentrar o microrganismo de interesse, a fim de melhorar a sua detecção. Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e testar a técnica de separação imunomagnética na detecção de *C. jejuni* em produtos de frango.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas cepas de diferentes espécies bacterianas comumente envolvidas em doenças transmitidas por alimentos, a fim de avaliar a especificidade do imunoensaio. *Escherichia coli* enteroinvasiva ATCC 1739, *E. coli* enteropatogênica ATCC 1741, *E. coli* enterohemorrágica ATCC 1740, *Enterobacter cloacae*

ATCC 23355, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Yersinia enterocolitica* INCQS 00098 e *Shyella dysenteriae* ATCC 13313 foram semeadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Acumedia, Michigan, EUA), incubadas *overnight* a 37°C em aerobiose e posteriormente semeadas em ágar MacConkey (MC, Kasvi, Itália) para confirmar a ausência de contaminantes. *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, após a cultura *overnight* em BHI, foram semeadas em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD, Himedia, Mumbai, Índia), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 em ágar Baird-Parker (BP, Himedia), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 nos ágaros Palcam (PA, Himedia) e Oxford (OA, Himedia), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 em ágar cetrimida (CA, Kasvi) e *Aeromonas hydrophila* INQS 00289 em ágar dextrina ampicilina (ADA, Himedia) com a mesma finalidade.

As cepas de *Campylobacter* utilizadas foram *C. coli* ATCC 33559, *C. jejuni* ATCC 33291, *C. jejuni* ATCC 33560 e 10 cepas selvagens, cinco de *C. coli* e cinco de *C. jejuni*, isoladas previamente de produtos cárneos de frango por Silva et al. (2014). Essas cepas foram cultivadas em caldo Brucella (Acumedia), por 48 horas, a 37°C em microaerofilia e posteriormente repicadas em ágar carvão cefoperazona deoxicolato modificado (mCCDA, Oxoid, Hampshire, Inglaterra).

Foram utilizadas micropartículas magnetizadas de 2,8µm de diâmetro (Dynabeads® M-270 Amine, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega), *Kit BioMag® Plus amine protein coupling* (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Alemanha) e anticorpos policlonais anti-*Campylobacter jejuni* (Thermo Scientific, USA). Esses reagentes foram preparados e estocados segundo as instruções do fabricante.

Uma alíquota de 100µL da solução do *Kit BioMag® Plus amine protein coupling* foi transferida para um *Eppendorf*, onde foram adicionados 800µL de tampão de lavagem piridina (PWB), juntamente com as micropartículas magnéticas aminofuncionais (MMP) (2 x 10⁹MMP/mL), e misturados vigorosamente em vórtex até que o sobrenadante estivesse limpo. O sobrenadante foi aspirado com o auxílio de uma micropipeta e descartado.

Detecção de *Campylobacter*...

Essa etapa de lavagem do sobrenadante foi repetida três vezes.

Posteriormente às lavagens, adicionaram-se 400µL de glutaraldeído 5% no *Eppendorf* com as partículas, os quais foram incubados em *shaker* rotatório para agitação constante por três horas, à temperatura ambiente, para ativação das partículas. Depois da ativação, as partículas foram concentradas usando-se um separador magnético MultiSep (Polysciences Inc., USA) até que o sobrenadante estivesse limpo, quando, então, era descartado. As MMP foram lavadas quatro vezes com 800µL de PWB.

As MMP ativadas (2×10^9 MMP/mL) foram suspensas em 800µL de PWB e mantidas a 4°C para uso posterior. Os anticorpos foram conjugados às esferas, adicionando-se 25µL de solução com anticorpo policlonal anti-*C. jejuni* (4mg/mL) aos 800µL de PWB com 2×10^9 MMP/mL. Após homogeneização, as partículas com os anticorpos foram incubadas em *shaker* rotatório para agitação constante, à temperatura ambiente, por 18-24h.

Logo após o período de incubação, com o uso do separador magnético, as partículas acopladas foram separadas do sobrenadante, que foi descartado. O *Eppendorf* com as partículas acopladas, após adição de 800µL de PWB e 400µL de solução *quenching*, foi incubado em *shaker* rotatório à temperatura ambiente, por 30 minutos. As MMP foram novamente separadas magneticamente, e o sobrenadante descartado. Após a realização de três lavagens com 800µL de PWB, as partículas (2×10^9 MMP/mL) foram suspensas em 1mL de PWB e estocadas a 2-8°C por, no máximo, um mês, para não perderem a atividade imunológica.

A ligação micropartícula-anticorpo foi avaliada por teste de aglutinação em lâmina com as cepas de referência utilizadas no experimento, a fim de avaliar a especificidade do anticorpo. Uma suspensão (2µL) da colônia da bactéria testada foi colocada em uma lâmina de vidro e misturada com 2µL da solução com as esferas sensibilizadas, observando-se precipitação, em caso positivo, ou uma suspensão translúcida, em caso negativo.

Anteriormente à contaminação experimental, foi verificada a concentração celular das culturas de

C. jejuni em espectrofotômetro (610nm), a fim de obter-se uma densidade populacional padronizada, e retiraram-se alíquotas para contagem padrão em ágar para confirmar o número real de bactérias adicionadas. A densidade ótica (DO) estabelecida foi de 0,45, a qual corresponde a 10^8 UFC/mL. Os caldos Brucella e Bolton foram utilizados na verificação da DO, e os ágares Columbia e mCCDA para a realização da contagem. Em nenhum dos meios foram observadas diferenças na turbidez ou na contagem. A relação DO x UFC/mL foi feita em triplicada em ambos os meios, e o resultado expresso pela média. Como branco no espectrofotômetro, foram utilizados caldos sem crescimento bacteriano.

Seis amostras de 25g de carne de frango moída foram contaminadas com três concentrações de *C. jejuni* (10^0 , 10^{-1} e 10^{-2} UFC/25g). Três delas foram analisadas logo após a contaminação, e as outras três após 24h de refrigeração a 4°C. As amostras de carne de frango antes da contaminação foram analisadas quanto à presença de *Campylobacter*, utilizando-se protocolo recomendado pela U.S. Food and Drug Administration – FDA (Hunt *et al.*, 2001). O controle negativo serve para determinar que não haja *Campylobacter* na amostra inicial. Cem amostras de produtos de frango (25 sobrecoxas, 25 asas, 25 peitos e 25 fígados) foram adquiridas no comércio varejista e imediatamente conduzidas sob refrigeração ao laboratório para análise pela metodologia convencional e pela IMS.

Como padrão-ouro, foi utilizado o método convencional recomendado pela FDA (Hunt *et al.*, 2001). Brevemente, uma alíquota de 25g da amostra foi pesada, acondicionada em saco plástico estéril, adicionada de 100mL de caldo Bolton (Himedia) suplementado com 10mg de cefoperazona, 10mg de vancomicina, 10mg de trimetoprim e 5mg de anfotericina (Himedia), homogeneizada por cinco minutos em *shaker* e incubada a 42°C, por 48 horas, em jarras contendo gerador atmosférico de microaerofilia – Microaerobac (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Passado esse período, uma alíquota (10µL) dessa cultura foi semeada na superfície de ágar mCCDA suplementado com 16mg de cefoperazona e 5mg de anfotericina B (Himedia) e incubada invertida em jarra de microaerofilia a

42°C, por 48 horas, para posterior confirmação fenotípica e genotípica.

Para IMS, foram utilizados os protocolos publicados por Tram *et al.* (2012) e Yu *et al.* (2001), com modificações. Brevemente, foram utilizadas alíquotas de 1mL da cultura em caldo Bolton e 20µL de microesferas sensibilizadas, em um tubo tipo *Eppendorf*. Depois da incubação à temperatura ambiente, por 15min, em agitação constante, as microesferas foram separadas da forma líquida, usando-se um separador magnético. Após 10min, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado, o magneto removido, e as microesferas lavadas seis vezes com 1mL de tampão PBS, ressuspensas em PBS, semeadas na superfície de ágar mCCDA com as adições já citadas no item anterior e incubadas em microaerofilia a 42°C, por 48 horas. Por fim, foi realizada a confirmação fenotípica e genotípica.

As colônias características de *Campylobacter* no ágar foram analisadas morfotintorialmente pela coloração de Gram. O gênero *Campylobacter* é constituído de bactérias Gram negativas com formato de bastonetes delgados espiralados ou em forma de “asa de gaivota” ou “S”, podendo apresentar forma filamentosa ou cocoide nos cultivos de longos períodos (Nachamkin, 2007).

Foram feitas as provas da produção das enzimas oxidase e catalase. *C. jejuni* é oxidase e catalase positivas. Após a identificação fenotípica das colônias características, estas foram analisadas pela técnica da reação em cadeia da polimerase multiplex (multiplex-PCR) para confirmação da espécie *C. jejuni*, de acordo com protocolo descrito por Harmon *et al.* (1997). Foram utilizados dois pares de *primers*: o par pg 3/pg 50, que amplifica uma região altamente conservada relacionada aos genes da flagelina, tanto em *C. jejuni* como em *C. coli*, e o par C-1/C-4, que amplifica uma região específica presente somente em *C. jejuni*. Os produtos das ampliações, corados com GelRed (Uniscience, São Paulo, São Paulo, Brasil), foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micropartículas magnéticas aminofuncionais foram ligadas covalentemente com os anticorpos usando-se o *Kit BioMag® Plus amine protein*

coupling e posteriormente acopladas com o anticorpo policlonal anti-*C. jejuni*, conforme descrição anterior, e a ligação micropartícula-anticorpo foi avaliada por teste de aglutinação em lâmina. Não foi observada reação cruzada com nenhum dos microrganismos testados. A reação positiva de aglutinação foi observada apenas nos testes com as cepas de *C. jejuni* ATCC 33291, ATCC 33560 e as cepas selvagens dessa espécie. Esses resultados demonstram que os anticorpos foram conjugados com as esferas magnéticas e que as suas atividades imunológicas se mantiveram funcionais após o processo de revestimento. Também mostra a especificidade dos anticorpos, que não reagiram com nenhuma espécie diferente de *C. jejuni*.

C. jejuni foi recuperado de todas as amostras experimentalmente contaminadas submetidas à IMS, tanto na hora 0 como após 24h, nas diferentes concentrações, assim como quando foi utilizado o método convencional. No entanto, quando utilizada a IMS, pode-se observar, nas lâminas de coloração de Gram, que houve presença de *Campylobacter* em maior número do que na metodologia convencional. Esse fato se deve provavelmente à ausência de contaminantes na IMS, o que não ocorreu utilizando a metodologia convencional, quando foi observado grande número de outros microrganismos morfotintorialmente distintos de *Campylobacter*. Tram *et al.* (2012) desenvolveram, pela primeira vez, um ensaio rápido e eficaz utilizando IMS-PCR direto com anticorpo monoclonal para detectar *C. jejuni* a partir de fezes de frango. Eles relataram ser possível detectar 10UFC/µL de fezes sem pré-enriquecimento e reduzir bastante o tempo de análise, pois requer só a reação da PCR. No entanto, essa pesquisa difere do presente trabalho em alguns aspectos: tipo de amostra, grau de detecção, não uso de caldo de pré-enriquecimento e tipo de anticorpo. Neste trabalho, foi possível detectar *C. jejuni* em concentrações bem menores (10⁰UFC/25g) do que no estudo de Tram *et al.* (2012) (10⁴UFC/mL), o que provavelmente tenha ocorrido pelo uso de pré-enriquecimento e anticorpo policlonal, tendo em vista que o pré-enriquecimento recupera células injuriadas e o anticorpo policlonal tem afinidade com diferentes regiões antigênicas da bactéria. Yu *et al.* (2001), mesmo utilizando anticorpo policlonal, densidades celulares de 10³-10⁷UFC de *C. jejuni*/g carne de frango na inoculação

Detecção de *Campylobacter*...

artificial e concentração de 10^6 - 10^7 esferas/mL para detecção, semelhante ao presente trabalho, detectaram *C. jejuni* apenas em concentrações de 10^4 UFC/g, bem maiores do que as concentrações detectadas neste estudo. Além disso, esses autores relataram que seus resultados não podem ser diretamente aplicados à prática porque sua pesquisa limitou-se apenas à inoculação artificial, sem realizar testes em produtos naturalmente contaminados.

C. jejuni foi isolado de sete (7%) amostras de frango naturalmente contaminadas, três asas, duas sobrecoxas, dois fígados e um peito, quando foi utilizada a IMS. Entretanto, somente três isolados, um de asa, um de sobrecoxa e outro de fígado, foram obtidos quando foi utilizado o método convencional.

A detecção de *C. jejuni* com IMS e o não isolamento da mesma amostra com o padrão-ouro demonstram que a técnica desenvolvida é mais sensível que a metodologia convencional, ao detectar o microrganismo em amostras que seriam dadas como negativas para *C. jejuni* pelo padrão-ouro. Outro fator importante é a especificidade da IMS. No gel de agarose (Fig. 1), pode-se observar que todas as amostras detectadas pela técnica desenvolvida neste trabalho foram confirmadas com sendo *C. jejuni* e a única amostra isolada pela metodologia convencional que não foi isolada com IMS é a que foi confirmada como *C. coli* pela não amplificação do fragmento C-1/C-4, que diferencia *C. coli* de *C. jejuni*.

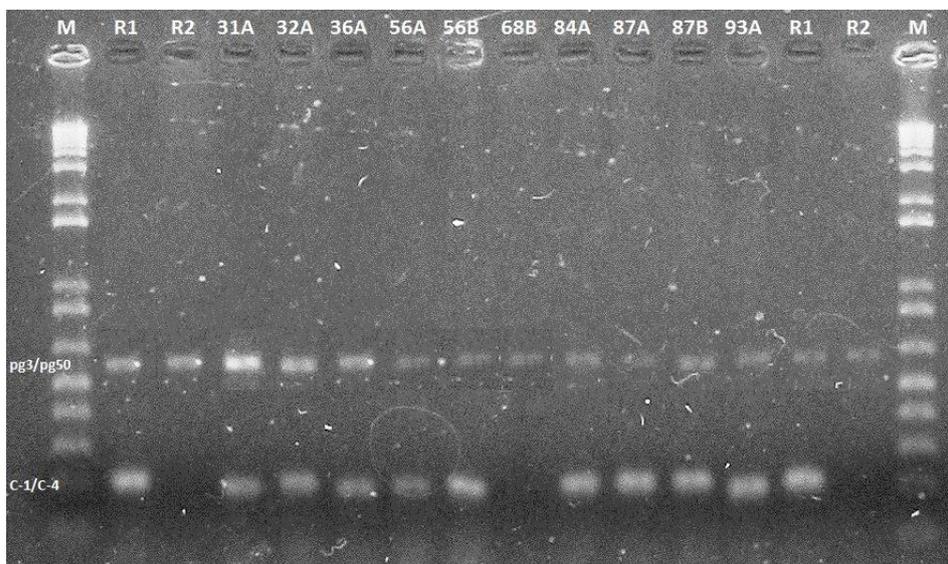


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por multiplex-PCR de isolados de amostras de produtos de frango naturalmente contaminados com *Campylobacter*. M: marcador de peso molecular; R1: cepa de referência de *C. jejuni*; R2: cepa de referência de *C. coli*; 31A: *C. jejuni* isolado de asa de frango por IMS; 32A: *C. jejuni* isolado de asa de frango por IMS; 36A: *C. jejuni* isolado de coxa de frango por IMS; 56A: *C. jejuni* isolado de asa de frango por IMS; 56B: *C. jejuni* isolado de asa de frango pelo padrão-ouro; 68B: *C. coli* isolado de coxa de frango pelo padrão-ouro; 84A: *C. jejuni* isolado de peito de frango por IMS; 87A: *C. jejuni* isolado de fígado de frango por IMS; 87B: *C. jejuni* isolado de fígado de frango pelo padrão-ouro; 93A: *C. jejuni* isolado de fígado de frango por IMS.

CONCLUSÕES

A técnica de separação imunomagnética pode ser usada para isolamento de *C. jejuni* de produtos de frango, com a vantagem de detectar o microrganismo em amostras a partir das quais o isolamento não é obtido com o uso do método

convencional. Adicionalmente, as culturas obtidas apresentam menor multiplicação de microrganismos contaminantes, o que dá maior segurança nos resultados.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R.B.; GEMELLI, T.; DALL ONDER, L.P. *et al.* Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. *Arq. Inst. Biol.*, v.77, p.741-750, 2010.
- CUDJOE, K.S.; HAGTVEDT, T.; DAINTY, R. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP) – ELISA. *Int. J. Food Microbiol.*, v.27, p.11-25, 1995.
- DONISSON, A.M.; ROSS, C.M. Microbiological safety of meat thermotolerant *Campylobacter*. *Encyclopedia of meat sciences*. 2.ed. Oxford: Elsevier, 2014.p.382-388, 2014.
- HARMON, K.M.; RANSOM, G.M.; WESLEY, I.V. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*, v.11, p.195-200, 1997.
- HUNT, J.M.; ABEYTA, C.; TRAN, T. *Campylobacter*. U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological analytical manual*. 2001. chap.7. Available in: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm072616.htm>>. Accessed in: 20 May 2016.
- NACHAMKIN, I. *Campylobacter jejuni*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. *Food microbiology: fundamental and frontiers*. 3.ed. Washington: ASM Press, 2007. p.237-248.
- PELLEGRIN, A.O.; MIRANDA, K.L.; FIGUEIREDO, J.F. *et al.* Uso do ensaio imunoenzimático e imunoblotting para detecção de imunoglobulinas contra *Campylobacter fetus* em muco cérvico-vaginal de fêmeas bovinas. *Pesqu. Vet. Bras.*, v.31, p.247-254, 2011.
- PERKO-MÄKELÄ, P.; ALTER, T.; ISOHANNI, P. *et al.* Distribution of *Campylobacter jejuni* isolates from Turkey farms and different stages at slaughter using pulsed-field gel electrophoresis and flaA-short variable region sequencing. *Zoonoses Public Health*, v.58, p.388-398, 2011.
- SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; BLUM-MENEZES, D. *et al.* *Campylobacter* species isolated from poultry and humans, and their analysis using PFGE in southern Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, v.217, p.189-194, 2016.
- SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; CUNHA, C.C. *et al.* Ocorrência de *Campylobacter* em carne de frango, fezes de frango e humanas e pesquisa dos genes *cdt*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.297-304, 2014.
- THEOPHILO, G.N.D.; JAKABI, M. *Campylobacter* spp.: diagnóstico laboratorial – métodos clássicos e moleculares. *WHO global salm-surv nível III capacitação integrada*, 2008. p.13-35. Disponível em: <[http://bvs.panalimentos.org/local/file/INCLUSI ONES2008/2GSS_CURSO_CAPACITACAO_ NIVEL3_BRASILIA2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/GSS-III-Manual%20Campylobacter.pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/file/INCLUSI%20ONES2008/2GSS_CURSO_CAPACITACAO_NIVEL3_BRASILIA2008_estanaBVS/GSS_2008_pdf/GSS-III-Manual%20Campylobacter.pdf)>. Acessado em: 20 maio 2016.
- TRAM, L.L.T.; CAO, C.; HOGBERG, J. *et al.* Isolation and detection of *Campylobacter jejuni* from chicken fecal samples by immunomagnetic separation PCR. *Food Control*, v.24, p.23-28, 2012.
- YU, L.S.L.; UKNALIS, J.; TU, S. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. *J. Immunol. Methods*, v.256, p.11-18, 2001.