

XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

Padronização de PCR Multiplex para Detecção Direta e Diferenciação de Espécies de *Campylobacter* em Queijo Minas Artesanal¹

Pedro Paulo Arcanjo Lima², Bianca Oliveira Hosken³, Amanda Gonelli Gonçalves⁴, Paula Aparecida Azevedo Almeida⁵, João Batista Ribeiro⁶, Humberto Moreira Hungaro⁷, Márcio Roberto Silva^{6,8}

¹Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig: (a) Parte da dissertação de mestrado da terceira autora

²Graduando em Medicina Veterinária – UFJF, Juiz de Fora, MG. Bolsista Pibic Fapemig. e-mail: pedrolima98@outlook.com

³Mestranda em Microbiologia Agrícola – UFV, Viçosa, MG. e-mail: biancahosken@gmail.com

⁴Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – UFJF. e-mail: amandagonelli@hotmail.com

⁵Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – UFJF. e-mail: paula.azevedo9@yahoo.com.br

⁶Pesquisador – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. e-mail: joao-batista.ribeiro@embrapa.br

⁷Professor – Faculdade de Farmácia – UFJF, Juiz de Fora, MG. e-mail: humbertomh@gmail.com

⁸Orientador. e-mail: marcio-roberto.silva@embrapa.br

Resumo: O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um potencial carreador de patógenos zoonóticos. *Campylobacter* spp. tem sido o patógeno mais frequentemente associado a surtos de doenças de origem alimentar no mundo. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma ferramenta promissora para uma detecção rápida e direta de *Campylobacter* nos alimentos. O objetivo deste estudo foi desenvolver um método molecular baseado em PCR multiplex para identificação direta de *Campylobacter* em QMA. No primeiro ensaio de PCR, as amostras foram artificialmente contaminadas com um mix igual de *C. jejuni* (CAMP 492) e *C. coli* (CAMP 1004) para ajustar as condições da PCR ($>10^8$ UFC/g) para estabelecer o limite de detecção. O DNA dessas amostras foi extraído pelo método que utiliza fenol/clorofórmio. Posteriormente, o ensaio de PCR multiplex foi realizado utilizando *primers* para os genes *Campylobacter* (16S rRNA), *C. jejuni* (*hipO*) e *C. coli* (*ceuE*). Cinco protocolos foram testados, variando diferentes concentrações de MgCl₂, tampão, concentração de DNA, temperatura de anelamento, concentração de gel de agarose e voltagem da corrida de eletroforese. A presença de *Campylobacter* spp. foi avaliada em 81 amostras de QMA de diferentes origens. O protocolo de PCR multiplex foi ajustado para as amostras artificialmente contaminadas. O limite de detecção foi estimado em 10^3 UFC/g. *Campylobacter* não foi encontrado em nenhuma dessas 81 amostras usando esse protocolo de PCR multiplex. No entanto, 29 (35,8%) dessas 81 amostras foram consideradas positivas, quando apenas os *primers* do gene 16S rRNA foram usados nas reações. O método padronizado é efetivo para detectar *Campylobacter* em amostras artificialmente contaminadas, mas não é robusto o suficiente para detecção em amostras de diferentes origens, provavelmente devido à complexidade da matriz desses queijos e baixo limite de detecção. Apesar disso, a presença de amostras positivas usando o primer 16S rRNA é um importante problema de saúde pública.

Palavras-chave: *Campylobacter*, PCR multiplex, Queijo Minas Artesanal

Development and Evaluation of Molecular Methodology Based on Polymerase Chain Reaction (PCR) For Identification of *Campylobacter* spp. in Artisanal Minas Cheese

Abstract: Artisanal Minas Cheese (AMC) is a potential carrier of zoonotic pathogens *Campylobacter* spp. has been the most frequent pathogen responsible for outbreaks of foodborne diseases worldwide. Molecular methods, especially Polymerase Chain Reaction (PCR), are promising tools for rapid and direct detection of *Campylobacter* in food. The aim of this study was to develop a molecular method based on multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* in AMC. In the first PCR assay, the samples were artificially contaminated with an equal mix of *C. jejuni* (CAMP 492) and *C. coli* (CAMP 1004) to adjust the PCR conditions ($>10^8$ CFU/g) and to set the detection limit. The DNA of these samples was extracted by phenol/chloroform method. Afterwards, the multiplex PCR assays were performed using *primers* for the genus *Campylobacter* (16SrRNA), *C. jejuni* (*hipO*) and *C. coli* (*ceuE*). Five protocols were tested, running in different concentrations of MgCl₂, buffer, DNA ng/μl in the PCR reactions, annealing temperature, agarose gel concentration, and voltage of electrophoresis running. The presence of *Campylobacter* spp. was evaluated in 81 AMC samples from different sources. A multiplex PCR protocol was adjusted for the artificially contaminated samples. The detection limit was estimated at 10^3 CFU/g. *Campylobacter* was not found in any of the 81 samples using this multiplex PCR protocol. In contrast, 29 (35,8%) of these 81 samples were positive, when only *primers* of the 16S rRNA gene were used in the reactions. The developed method is effective to detect *Campylobacter* in artificially contaminated samples but is not



Gado de Leite



XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

robust enough for detection in samples from different sources, probably due to the complexity of these cheese matrixes. Despite this, the presence of positive samples using the *primer* 16s rRNA is an important public health problem.

Keywords: Artisanal Minas Cheese, *Campylobacter*, PCR multiplex

XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite
Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

INTRODUÇÃO

O Queijo Minas Artesanal (QMA) é um dos mais antigos e tradicionais queijos do Brasil. Embora muito popular, o QMA nem sempre apresenta inocuidade suficiente, uma vez que aliado à utilização de leite cru recém-ordenhado e à falta de padronização da fabricação, existe ainda uma deficiência de fiscalização na cadeia produtiva, tornando-o um potencial veiculador de microrganismos patogênicos (Dores, 2013).

Dentre os microrganismos patogênicos que podem ser veiculados através de QMA e que possui grande importância na saúde pública, *Campylobacter* tem sido o patógeno mais frequentemente associado a surtos de doenças de origem alimentar (DOA) em todo o mundo, podendo causar a campilobacteriose, infecção gastrointestinal auto limitante que pode evoluir para complicações severas como a síndrome de Guillain-Barré (Who, 2016).

A identificação de *Campylobacter* em amostras de alimentos por meio de métodos convencionais dependentes de cultivo é de difícil execução devido a diversos fatores, como a natureza fastidiosa deste microrganismo. Além disso, podem apresentar significativas variações nos resultados obtidos e na precisão quanto à diferenciação dos organismos do mesmo gênero (Debruyne et al., 2008). Em contrapartida, métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são ferramentas promissoras para a rápida e direta detecção de *Campylobacter* em alimentos (De Boer et al., 2015). Entretanto, alimentos como os queijos são matrizes complexas em termos de composição química e microbiológica, podendo apresentar inibidores da PCR (Schrader et al., 2012).

Diante da complexidade dos queijos e da diversidade de QMA comercializados no Brasil o presente estudo foi desenvolvido visando à padronização de um método rápido, de baixo custo e eficiente baseado em PCR multiplex para detecção de *Campylobacter* em QMA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas como controle positivo dos métodos, estirpes bacterianas de *Campylobacter jejuni* (CCAMP 492) e *Campylobacter coli* (CCAMP 1004) pertencentes à Coleção de *Campylobacter* (CCAMP) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

As amostras foram contaminadas artificialmente com uma mistura igual de *C. jejuni* (CAMP 492) e *C. coli* (CAMP 1004) para ajustar as condições de PCR ($> 10^8$ UFC/mL) e para determinar o limite de detecção (10^6 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 1 UFC/mL).

O DNA dessas amostras foi extraído pelo método orgânico que utiliza fenol/clorofórmio. Sequências de *primers* para o gene *16S rRNA* (857 bp) que identificam o gênero *Campylobacter* spp. nas amostras. As espécies foram identificadas usando sequências de *primers* para detectar o gene *hipO* (753 bp), específico para *C. jejuni* e o gene *ceuE*, (462 bp), específico para *C. coli*. Para avaliar os *primers*, o DNA de cinco amostras foi submetido a PCR monoplex e, posteriormente, na padronização da PCR multiplex.

Para a padronização da PCR multiplex foram testados cinco protocolos, os quais diferiram em concentração de $MgCl_2$, tampão 10x, concentração de DNA nas reações de PCR, temperatura de anelamento, concentração de gel de agarose e voltagem da corrida eletroforética.

Para a determinação da prevalência de *Campylobacter* spp. em amostras de QMA foi extraído o DNA de 81 amostras de QMA fornecidas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). Estas foram analisadas primeiramente por PCR monoplex utilizando o *primer* para o gene *16S rRNA* e, posteriormente pela PCR multiplex para diferenciação das espécies. As PCRs foram analisadas por eletroforese em gel de agarose corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta.

Para avaliar a efetividade do método a partir da detecção de fragmentos de DNA específico em amostras de QMA foi realizado o teste com enzimas de restrição. Para tal, utilizou-se o programa NebCutter® v. 2.0 e as enzimas *XhoI* (para o gene *16S rRNA*), *HhaI* (para o gene *hipO*) e *HindIII* (para o gene *ceuE*).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes de padronização de PCR multiplex foram satisfatórios nos testes 4 e 5. No teste 4 foi possível detectar *Campylobacter* spp. e diferenciar as espécies *C. jejuni* e *C. coli* através da amplificação de fragmentos de 867 pb, 735 pb e 432 pb, respectivamente. A diminuição da concentração do DNA no teste 5 contribuiu positivamente para a resolução do gel, pois as bandas se apresentaram bem

XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

delimitadas, com redução do arraste. Como observado no presente estudo e por Henegariu et al. (1997), o tampão e a temperatura de anelamento foram os dois parâmetros mais importantes na obtenção de altos rendimentos dos produtos específicos de PCR.

O limite de detecção do gênero *Campylobacter* spp. e das espécies *C. jejuni* e *C. coli* foi estimado em 10^3 UFC/mL, tanto no PCR monoplex quanto no multiplex realizados em amostras de QMA contaminados artificialmente. O mesmo resultado foi encontrado por Mayr, et al. (2010), que desenvolveram uma PCR multiplex para a detecção e diferenciação das espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em alimentos utilizando diluição em série para culturas puras. Sendo assim, a presença ou ausência do patógeno é corretamente indicada como $> 10^3$ UFC/mL ou $< 10^3$ UFC/mL, respectivamente, uma vez que abaixo da concentração de 10^3 UFC/mL não é possível avaliar a presença do patógeno.

O resultado obtido no teste com enzimas de restrição foi o esperado. A enzima *XhoI* para o gene *16S rRNA* gerou dois fragmentos de DNA com cerca de 140 pb e 717 pb. Já a enzima *HhaI* para o gene *hipO* gerou dois fragmentos de DNA com cerca de 300 pb e 435 pb. Por fim, a enzima *HindIII* para o gene *ceuE* gerou dois fragmentos com cerca de 110 pb e 352 pb. Estes fragmentos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose. Assim, foi possível ter uma forte evidência que os isolados eram os microrganismos de interesse. O uso de enzimas de restrição foi uma alternativa prática e rápida à impossibilidade de realizar o sequenciamento das amostras e foi importante para complementar a padronização da PCR multiplex.

Quanto à prevalência de *Campylobacter*, na análise do gel nas 81 amostras para o gene *16S rRNA*, 29 (35,8%) amostras foram constatadas como positivas para o gênero. Para análise dos genes *hipO* e *ceuE*, foram feitos 4 géis para a PCR multiplex a fim de realizar uma análise comparativa. Todavia, houve incompatibilidade de resultados em relação à PCR monoplex para o gene *16S rRNA*, o que impossibilita a definição das amostras positivas ou negativas para *Campylobacter* spp., tampouco realizar a diferenciação entre *C. jejuni* e *C. coli*. Logo, o método multiplex padronizado é inconclusivo para amostras de campo, mas é eficiente para amostras de culturas puras e amostras artificialmente contaminadas.

A inconsistência encontrada nos resultados da aplicação da PCR multiplex padronizada neste estudo poderia ser devido ao fato das amostras potencialmente positivas apresentarem concentração de *Campylobacter* spp. abaixo do limite de detecção do método. Uma alternativa para reverter essa condição seria o enriquecimento das amostras em meio seletivo. Outro ponto importante a ser considerado é a presença de inibidores da PCR inerentes a matriz e ao processo de extração. Também é importante salientar que o método foi padronizado para QMA do Serro e que entre as amostras há queijos de outras regiões, que possuem modo de fabricação, microbiota endógena e composição geral variáveis. Sendo assim, é plausível que amostras de regiões diferentes possam apresentar perfis diferentes no gel.

CONCLUSÕES

Conclui-se que o método desenvolvido é eficaz para detectar *Campylobacter* em amostras de QMA contaminadas artificialmente, mas não é robusto o suficiente para detecção em amostras de diferentes fontes, provavelmente devido à complexidade dessas matrizes de queijo. Apesar disso, a presença de amostras positivas utilizando o primer *16S rRNA* indica risco potencial à saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Embrapa pela oportunidade e a todos que me auxiliaram durante o período da minha iniciação científica, em especial ao meu orientador Márcio Roberto Silva, ao Dr. João Batista Ribeiro, às mestres Amanda Gonelli e Paula Azevedo e à mestranda Bianca Hosken, por dividirem comigo um pouco de seu conhecimento.

REFERÊNCIAS

DE BOER, P.; RAHAOUI, H.; LEER, R. J.; MONTIJN, R. C.; VAN DER VOSSSEN, J. M. B. M. Real-time PCR detection of *Campylobacter* spp.: A comparison to classic culturing and enrichment. **Food Microbiology**, v. 51, p. 96-100, 2015.

XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

DEBRUYNE, L.; GEVERS, D.; VANDAMME, P. Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. In *Campylobacter*, 3rd ed. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C., p. 3-26, 2008.

DORES, M. T.; NOBREGA, J. E; FERREIRA, C. L. L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, 2013.

HENEGARIU, O., et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. **BioTechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.

MAYR, A. M., et al. Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 73, n. 2, p. 241-250, 2010.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p. 1014-1026, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Campylobacter*. 2016. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>.