Desarrollo de un microinmunoensayo para la detección de *Campylobacter spp*. a nivel de granja

S. INGRESA-CAPACCIONI[1*], E. MONTERO[1], S. MORAIS[2], A. MAQUIERA[2], S. VEGA[1], F. MARCO-JIMÉNEZ[3], y C. MARÍN[1]

[1]Dpto. Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, UCH-CEU, Alfara del Patriarca, España, [2]IDM, Dpto. Química e [3]Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, España. *email: sofia.ingresa@uchceu.es

Desde hace más de una década, *Campylobacter* encabeza la lista de los agentes zoonóticos que mayor número de infecciones producen en la Unión Europea y en la mayoría de los países industrializados, siendo su principal fuente de infección la carne de pollo y sus derivados. Por este motivo, las autoridades europeas han priorizado la reducción de *Campylobacter* spp a nivel de producción primaria, para evitar su paso a la cadena alimentaria. En la actualidad, la identificación de la bacteria se lleva a cabo mediante métodos de cultivo tradicionales basados en la norma ISO 10272:2006. Esta metodología es cara, lenta, y tediosa. Por ello, el desarrollo de métodos más efectivos de detección y cuantificación es imprescindible desde el punto de vista de la salud pública y la seguridad alimentaria. En este contexto, el objetivo de este estudio fue el desarrollo de un inmunoensayo competitivo en formato de micromatriz sobre discos DVD para la cuantificación rápida de *Campylobacter* spp con detección colorimétrica. Las principales ventajas de la metodología desarrollada son la sensibilidad (límite de detección equivalente a $2 \cdot 10^2$ ufc/mL), selectividad y rapidez (45 min), permitiendo el análisis de decenas de muestras simultáneamente en un disco. Las prestaciones analíticas del ensayo desarrollado hacen de esta metodología una aproximación muy interesante para la rápida detección de *Campylobacter* spp. *in situ*, tanto a nivel de producción primaria, como en matadero, lo que facilitaría la rápida toma de decisiones y medidas de control.

Palabras clave: *Campylobacter*; microarray; DVD, método de screening.

***Campylobacter* is considered the leading cause of gastroenteritis in the European Union and most industrialized countries, with chicken meat the main source of infection in people. The control of *Campylobacter* in primary broiler production is therefore a key element in public health strategies to reduce the number of human campylobacteriosis cases. Currently, *Campylobacter* isolation and identification is carried out according to ISO standard 10272:2006 (Annex E). However, this methodology is labor-intensive and time-consuming, and required up to 6 days to produce a confirmed positive result. From a public health point of view, there is a need for more reliable and rapid methods for *Campylobacter* detection and quantification. To that aim, we developed a competitive microimmunoassay on a DVD with colorimetric detection for rapid quantification of *Campylobacter* spp. Using this technology, we were able to detect as low as $2 \cdot 10^2$ ufc/mL. This novel technique has several advantages as a screening method compared to traditional methods, including low cost technology, a short time of analysis, the possibility of automation of the test, and multiple scale analysis production. The analytical performance of the assay make this a very interesting methodology for rapid detection of *Campylobacter* spp. in situ, at the level of primary production and slaughter, which would facilitate rapid decision-making and implementation of control measures.**

Key words: *Campylobacter*; microarray; DVD; screening.

Introducción

Campylobacter es la primera causa de enfermedades zoonóticas en la Unión Europea (EFSA, 2015) con más de 200.000 casos confirmados. No obstante, la incidencia real es mayor y se estima en 9 millones los casos anuales, con un coste aproximado generado a los sistemas de salud pública de 2.4 billones de euros al año (EFSA, 2011). La principal fuente de infección por *Campylobacter* es el consumo de carne de pollo poco cocinada o la contaminación cruzada entre ésta y otros alimentos durante la elaboración de productos derivados (Friedman et al., 2000; Jacobs-Reitsma, 2000; Corry and Atabay, 2001; EFSA, 2015).

Se ha estimado mediante modelos de evaluación cuantitativa del riesgo, que una reducción del orden de 2 log en la carga microbiana de *Campylobacter* en las canales, disminuiría el riesgo atribuido a la carne de pollo en un 90% (Rosenquist et al., 2003; EFSA, 2011). Para conseguir este objetivo se han planteado estrategias de control a diferentes niveles dentro de la cadena alimentaria, aunque la mayoría de autores coinciden en que la reducción de la prevalencia de la bacteria a nivel de producción primaria conduciría a un control más eficaz (Wagenaar et al., 2006). Por ese motivo, las autoridades europeas han priorizado la reducción de *Campylobacter* spp a nivel de producción primaria, para evitar su paso a la cadena alimentaria. La dificultad es doble; las vías de entrada de *Campylobacter* en las naves de pollos de engorde son múltiples, y la epidemiología de la bacteria no es bien conocida, dificultando su control a nivel de campo.

En España, los datos publicados por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria indican que el 88% de los lotes de pollos de engorde están infectados por *Campylobacter*, con recuentos superiores a 10^8 ufc/g en contenido cecal (EFSA, 2015; Seliwiorstow et al., 2015). A pesar de la importancia de la carne de pollo como principal reservorio de la campylobacteriosis humana, hasta la fecha no se han establecido criterios microbiológicos para la presencia de *Campylobacter* en la carne de pollo. Sin embargo, la Comisión Europea está trabajando en una nueva regulación sobre criterios microbiológicos para *Campylobacter* en carne de pollo. Por consiguiente, la monitorización de lotes de pollos de engorde es una estrategia clave para el control de *Campylobacter* en producción avícola (Josefsen et al., 2015).

En la actualidad, la identificación de la bacteria se lleva a cabo mediante el cultivo microbiológico de las muestras según las recomendaciones de la normal oficial ISO 10272:2006 (Anonymous, 2006). Esta metodología es cara, lenta, y tediosa, ya que requiere al menos 6 días para el aislamiento y caracterización bioquímica del microorganismo. Otro de las principales inconvenientes de estos métodos es la baja sensibilidad y especificidad, ya que no son capaces de detectar células en estado viable pero no cultivable (VBNC), lo que se traduce en la obtención de falsos negativos (Li et al., 2014).

La reducción del tiempo de diagnóstico es un factor determinante a la hora de tomar decisiones y medidas de control para evitar el paso de *Campylobacter* al resto de la cadena alimentaria. Por ello, existe una demanda creciente de desarrollo de metodologías analíticas rápidas, sensibles y selectivas para la detección y cuantificación de patógenos alimentarios *in situ*, que permitan además controlar el cumplimiento de las nuevas regulaciones.

Los immunoensayos son una alternativa muy interesante como método de *screening* para la monitorización y detección de patógenos *in situ* (Van Dorst et al., 2010) debido principalmente a su elevada sensibilidad, selectividad, variedad de formatos y materiales y sistemas de detección. En este área, los materiales procedentes de la industria electrónica como los discos compactos de audio/video (DVDs) constituyen una prometedora plataforma de análisis, debido a sus buenas propiedades ópticas, producción en masa, y bajo precio. Además, los lectores de discos pueden utilizarse como detectores. Así, hasta la fecha, en la bibliografía se han descrito varias aproximaciones que utilizan los elementos de la tecnología de disco compacto (disco como plataforma y lector como detector) para análisis clínico, químico, medioambiental y alimentario (Morais et al., 2016). Las características físico-

químicas del disco hacen de esta superficie una excelente plataforma analítica, que permite la realización de inmunoensayos en formato micromatriz, minimizando el gasto de reactivos, y reduciendo considerablemente los tiempos de ensayo. Por este motivo, el objetivo de este estudio fue el desarrollo de un microinmunoensayo competitivo basado en tecnología de disco compacto para la cuantificación rápida de *Campylobacter* spp.

Material y métodos

Inmunoensayo competitivo sobre DVD para la detección de Campylobacter spp

Preparación de cultivos puros

Para la preparación de cultivos puros se sembraron cepas de *C. jejuni* y *C. coli* en agar Columbia sangre (AES laboratories ®, Bruz Cedex, France), y se incubaron a 41,5 ºC durante 48 h en atmósfera microaerofílica (5%O_2, 85% N_2, 10% CO_2), (CampyGen®, Oxoid). Posteriormente, las colonias aisladas se transfirieron a un caldo de cultivo cerebro corazón infusión (BHI, Oxoid, Barcelona, Spain) y se incubaron en atmósfera microaerofílica bajo las condiciones que se indican anteriormente. Por otro lado, para los ensayos de selectividad se prepararon cultivos de *Salmonella* spp. Las cepas de *Salmonella* se sembraron en agar nutritivo y se incubaron a 37 ºC durante 24 h. Posteriormente, las colonias aisladas se transfirieron a caldo Luria-Bertani (LB, Scharlau®, Barcelona, Spain) y se incubaron a 37 ºC durante 24 h.

A continuación, se midió la densidad óptica (OD) de los cultivos a 600 nm (OD_{600}) mediante espectrofotometría (UV-1, Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). Los cultivos bacterianos se diluyeron utilizando caldos de cultivo LB y BHI, hasta alcanzar una OD_{600} final de 0,2 (10^6 ufc/mL). A continuación se prepararon diluciones seriadas del cultivo de *Campylobacter* desde 10^5 hasta 10^0 ufc/ml.

Inmunoensayo competitivo

El protocolo de trabajo del inmunoensayo se detalla en la *Figura 1*. En primer lugar, un vial eppendorf con 1,0 mL de cultivo puro (10^6 ufc/mL) se introdujo en un termobloque a 90 ºC durante 15 minutos como procedimiento de lisis bacteriana. A continuación, 50 nL de la disolución de cultivo lisado se imprimieron en forma de micromatriz mediante un dispensador de líquidos (Biodot AD1500), imprimiendo un total de 20 matrices (2×2 puntos, *Figura 1*). El disco se dejó incubar 16 h a 37ºC. Tras la incubación, el disco se lavó con agua destilada. Posteriormente, se prepararon diluciones seriadas de *Campylobacter* (10^0-10^6 ufc/mL) a las que se añadió anticuerpo policlonal anti-*Campylobacter* spp marcado con oro a una dilución 1:500 en PBS-T (PBS con 0.05% Tween 20). Tras 15 min de incubación, se dispensaron 25 µL sobre cada matriz y se dejó reaccionar durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, el disco se lavó con agua destilada. A continuación, se dispensó 1,0 mL de disolución de revelado de plata sobre la superficie del disco, distribuyéndola homogéneamente mediante un cubre disco de plástico de 12 cm de diámetro. La disolución de revelado se dejó incubar durante 10 minutos. Finalmente, el disco se lavó con agua destilada. El precipitado metálico formado como consecuencia de la reacción inmunológica modifica las propiedades ópticas del disco, provocando la variación de la intensidad del haz láser que llega al fotodiodo del pickup del lector de DVD. De este modo, la variación de señal analógica se correlaciona con la concentración de *Campylobacter*.

El principio del ensayo se basa en establecer una competición entre *Campylobacter* inmovilizada en disco y en disolución (muestra) por los sitios de unión del anticuerpo específico marcado con oro. Así, en ausencia de *Campylobacter* se obtiene la máxima señal analítica, disminuyendo ésta a medida que aumenta la concentración de *Campylobacter* en disolución (*Figura 1*).

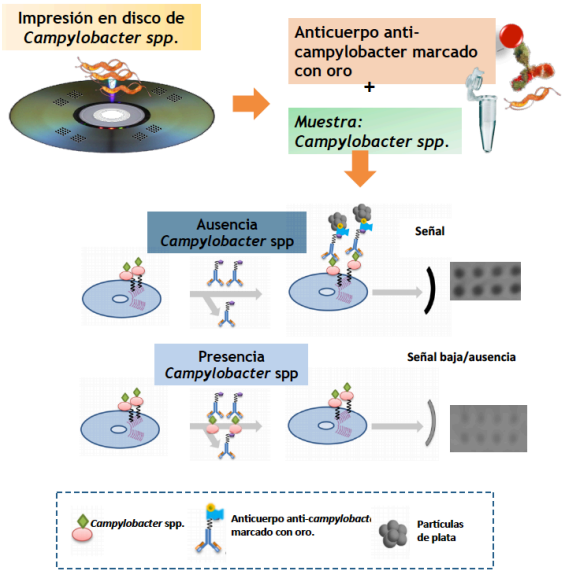

Figura 1. Esquema del inmunoensayo competitivo.

Análisis de los datos

Para el análisis de los resultados se utilizó un lector/grabador convencional de DVDs, que permitió registrar la imagen del microarray, utilizando el diodo de luz del lector como la única fuente láser de barrido (Morais et al., 2007; *Figura 2*). El principio del sistema de detección se basa en la atenuación de la intensidad del haz del láser reflejado, que es detectada por el fotodiodo del cabezal óptico del grabador durante la lectura del disco. La señal de reflexión detectada se relaciona con la densidad óptica del producto de la reacción, que está directamente relacionada con la concentración de *Campylobacter*. Las imágenes obtenidas del análisis de los discos son procesadas y analizadas mediante un programa informático como se describe en Morais et al. (2009).

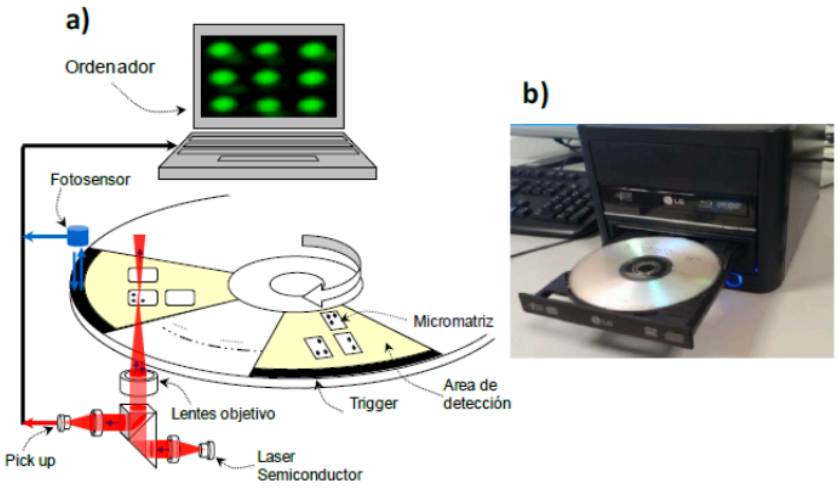

Figura 2. Esquema del sistema de detección. a) Esquema del sistema de detección, b) Imagen del detector utilizado en este estudio (Morais et al., 2007).

Resultados y Discusión

En este estudio se describe la metodología de un inmunoensayo competitivo en formato de micromatriz en DVDs con detección colorimétrica para la cuantificación rápida de *Campylobacter* spp. La optimización del ensayo comprendió el estudio del efecto de variables, como tampón y volumen de impresión, tiempos de incubación, concentración de anticuerpo detector en la sensibilidad del ensayo. Utilizando como criterios de selección, sensibilidad y una buena relación señal ruido (S/R > 60), los mejores resultados se obtuvieron imprimiendo 50 nL de una disolución 10^6 de *Campylobacter* preparada en PBS, pH 7,4 como medio de impresión, 25 µL de muestra, una dilución 1/500 (v/v) de anticuerpo detector en PBST y 15 min de incubación en disco y una etapa de revelado de la inmunointeracción de 10 min de duración. La curva de calibrado del ensayo bajo las condiciones descritas se muestra en la *Figura 3*. La señal máxima alcanzada en ausencia de analito fue 13.850 que corresponde a una S/R de 75. El límite de detección alcanzado para *Campylobacter* spp. fue $2 \cdot 10^2$ ufc/mL, con un rango lineal de trabajo de $8{,}5 \cdot 10^2$ - $8{,}5 \cdot 10^4$ ufc/mL. La reproducibilidad del ensayo osciló en el rango 8-17%. La concentración de *Campylobacter* spp. que inhibió la señal máxima un 50% (EC_{50}) corresponde a 10^4 cfu/mL. Por otro lado, la selectividad del ensayo se evaluó mediante la determinación de la reactividad cruzada, utilizando *Salmonella* spp como interferente. Como se observa en la curva, el ensayo es selectivo, mostrando una reactividad cruzada baja (11,8%), lo que corrobora la buena selectividad del ensayo.

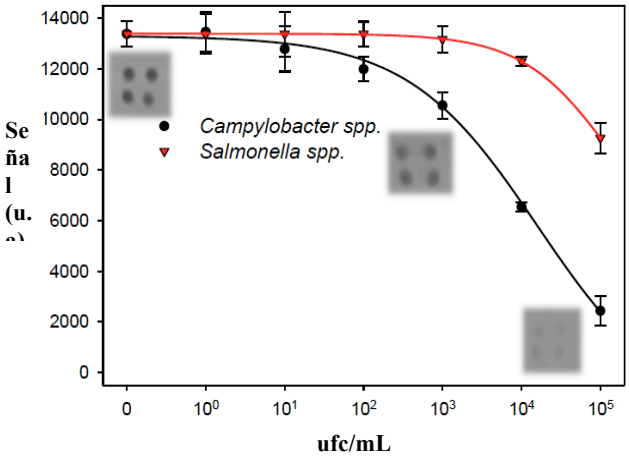

Figura 3. Curva de calibrado para *Campylobacter* spp. Los paneles corresponden a las imágenes obtenidas de la lectura del ensayo con el lector de DVD.

Debido a la necesidad de realizar un control de animales o de productos derivados de una forma rápida y eficaz, en los últimos años muchos grupos de investigación han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de técnicas analíticas más rápidas y sensibles (Lazcka et al., 2007). Actualmente, existen tres métodos de enzimoinmunoanálisis (EIA) disponibles en el mercado para la detección directa de *Campylobacter* en heces (ProSpecT *Campylobacter* assay, Remel, Lenexa, KS; PREMIER™ CAMPY assay and ImmunoCard STAT! CAMPY, Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, CDC). No obstante, el principal inconveniente de estos métodos es que están diseñados para el diagnóstico de *Campylobacter* en muestras clínicas de heces donde se espera que una elevada concentración del patógeno. Por ese motivo, el límite de detección de estos dispositivos es cercano a $10^{6\text{-}7}$ ufc/g, valor muy superior al criterio microbiológico establecido en el borrador de la legislación europea (Granato et al., 2010).

Dentro del área de las nuevas metodologías, la tecnología de disco compacto tiene un gran potencial debido a sus atractivas características analíticas y ésta se ha empleado satisfactoriamente para la determinación de biomarcadores (Morais et al., 2008), antibióticos y plaguicidas (Morais et al., 2009), alérgenos alimentarios (Tortajada-Genaro et al., 2012), toxinas y patógenos como *Salmonella* spp. y

Cronobacter spp. (Arnandis-Chover et al., 2014). Hasta la fecha, esta es la primera vez que se describe el desarrollo de un ensayo en formato de micromatriz en disco DVD para la detección de *Campylobacter* spp. La tecnología de micromatrices sobre DVDs presenta una serie de ventajas respecto a otros métodos analíticos que pueden resumirse en: gran área analítica lo que perimite analizar varias muestras simultáneamente, elevada eficiencia de inmovilización de proteínas, reduciendo el uso de inmunorreactivos, fabricación en masa con excelente calidad a muy bajo precio, y tiempo de análisis corto. Además el uso del lector/grabador de CDs como detector, supone una ventaja adicional en cuanto a que se comercializa a bajo precio, es compacto y robusto en funcionamiento, facilidad de uso, ubicuidad y puede ser manejado fuera del laboratorio por personal no experto. En definitiva, estas prestaciones hacen de la tecnología de disco compacto en su conjunto una herramienta muy útil y aplicable para la detección sensible y selectiva de patógenos *in situ*.

Se ha desarrollado una herramienta de análisis basada en la tecnología de disco compacto aplicable a la detección de *Campylobacter spp*. Las prestaciones analíticas del microinmunonsayo hacen de esta metodología una aproximación muy interesante para la detección rápida *in situ* de *Campylobacter* spp., tanto a nivel de producción primaria, como en matadero, lo que facilitaría la rápida toma de decisiones y medidas de control. Además, la buena sensibilidad del ensayo desarrollado (límite de detección de $2 \cdot 10^2$ ufc/mL) permite la cuantificación de *Campylobacter* spp. de acuerdo a los criterios establecidos en el borrador de la legislación de la Comisión Europea.

Bibliografía

ARNANDIS-CHOVER, T., MORAIS, S., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, M.A., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A. (2014) High-density microarrays on Blu-ray discs for massive screening. *Biosensors and Bioelectronics* **51**: 109-114.

Commission Regulation (EC) 2073 on Microbiological criteria for foodstuffs of 2005. Pub.L.No 338, 1-26, 22nd December 2005.

ANONYMOUS. (2006) Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. International Organisation for Standardisation, Geneva, Swiztzerland.

CORRY, J.E. AND ATABAY, H.I. (2001) Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 96S-114S.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2011) Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal* **9**, 2105.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. (2015) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014. *EFSA Journal* **13**: 4329.

FRIEDMAN, C.R., NEIMANN, J., WEGENER, H.C., TAUXE, R.V. (2000) Epidemiology of *C. jejuni* infections in the United States and other industrialized nations, in: *Campylobacter* (I. Nachamin and M.J. Blaser eds), pp 121-138, Washington, DC: ASM Press.

GRANATO, P., CHEN, L., HOLIDAY, I., RAWLING, R., NOVAK-WEEKLEY, S., QUINLAN, T., MUSSER, K. (2010) Comparison of premier CAMPY enzyme immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and ImmunoCard STAT! CAMPY tests with culture for laboratory diagnosis of *Campylobacter* enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 4022-7.

JACOBS-REITSMA, W. (2000) *Campylobacter* in the food supply, in: *Campylobacter* (I. Nachamkin and M.J. Blaser eds), pp 467–481, Washington, DC: ASM Press.

JOSEFSEN, M.H., BHUNIA, A.K., ENGVALL, E.O., FACHMANN, M.S., HOORFAR, J. (2015) Monitoring *Campylobacter* in the poultry production chain—from culture to genes and beyond *Journal of Microbiological Methods* **112**: 118-25.

LAZCKA, O., DEL CAMPO, F.J., MUÑOZ, F.X. (2007) Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **22**: 1205-17.

LI, L., MENDIS, N., TRIGUI, H., OLIVER, J.D., FAUCHER, S.P. (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*. **5**:258.

MORAIS, S., CARRASCOSA, J., MIRA, D., PUCHADES, R., MAQUIEIRA A. (2007) Microimmunoanalysis on standard compact discs to determine low abundant compounds. *Analytical Chemistry* **79**: 7628-35.

MORAIS, S., TAMARIT-LÓPEZ, J., CARRASCOSA, J., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A. (2008) Analytical prospect of compact disk technology in immunosensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**: 2837-2844.

MORAIS, S., TORTAJADA-GENARO, L.A., ARNANDIS-CHOVER, T., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A. (2009) Multiplexed microimmunoassays on a digital versatile disk. *Analytical Chemistry* **81**: 5646-5654.

MORAIS, S., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A. (2016) Disc-based microarrays: principles and analytical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408**, 4523-4534.

ROSENQUIST, H., NIELSEN, N.L., SOMMER, H.M., NØRRUNG, B., CHRISTENSEN, B.B. (2003) Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology* **83**: 87-103.

SELIWIORSTOW, T., BARÉ, J., VAN DAMME, I., UYTTENDAELE, M., DE ZUTTER, L. (2015) *Campylobacter* carcass contamination throughout the slaughter process of *Campylobacter*-positive broiler batches. *International Journal of Food Microbiology* **194**:25-31**.**

TORTAJADA-GENARO, L.A., SANTIAGO-FELIPE, S., MORAIS, S., GABALDÓN, J.A., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A. (2012) Multiplex DNA detection of food allergens on a digital versatile disk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 36-43.

VAN DORST, B., MEHTA, J., BEKAERT, K., ROUAH MARTIN, E., DE COEN, W., DUBRUEL, P., BLUST, R., ROBBENS, J. (2010) Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics* **26**: 1178-94.

WAGENAAR, J.A., MEVIUS, D.J., HAVELAAR, A.H. (2006) *Campylobacter* in primary animal production and control strategies to reduce the burden of human campylobacteriosis. *Revue Scientifique et Technique*. **25**: 581-94.