

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



AValiação da Técnica de Imunização Genética Visando a Produção de Anticorpos Monoclonais Contra a Proteína OmpX DE *Salmonella Enteritidis*

BANDEIRA, Rafaela Oliveira¹; SEHN, Carla Pohl²; DE CARLI, Eduardo³; CONRAD, Neida Lucia³; MENDONÇA, Marcelo²; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo²; DA HORA, Vanusa Pousada²; DELLAGOSTIN, Odir Antonio²; ALEIXO, José Antonio Guimarães²; MOREIRA, Ângela Nunes².

¹ Bolsista BIC/FAPERGS – UFPel;

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – UFPel;

³ Bolsista CNPq – UFPel

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900,

nutribandeira@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A detecção de salmonela através de diagnóstico microbiológico convencional requer um período de tempo longo sendo, portanto, uma das principais razões para a realização de um número cada vez maior de pesquisas utilizando novas técnicas de triagem objetivando detectar salmonelas em alimentos (Reis et al., 2001; Rodrigues, 2002). Dentre os métodos imunológicos disponíveis no mercado, o ELISA é um dos mais utilizados, devido a facilidade de execução, rapidez na obtenção de resultados, boa sensibilidade e especificidade quando comparado à metodologia convencional de cultivo (Moreira, 2005).

A utilização de anticorpos monoclonais (MAbs) contra antígenos de superfície específicos de salmonelas aumenta a especificidade de métodos imunológicos de detecção e facilita sua padronização. Além disso, os MAbs podem ser mantidos em meio de cultivo e estocados durante longos períodos, dispensando a necessidade de manutenção de animais doadores (Cardozo, 2001).

Os MAbs podem ser produzidos utilizando a imunização clássica com proteínas recombinantes ou a imunização genética. Na produção de MAbs utilizando imunização genética, o gene que codifica para o antígeno de interesse é clonado em um plasmídeo de expressão em eucariotos, o plasmídeo é injetado no músculo dos animais e a proteína é expressa *in vivo* (Tang et al., 1992).

O gene *ompX*, que codifica uma proteína de membrana externa constituinte de uma ilha de patogenicidade importante para infecções sistêmicas e específica de *S. Enteritidis*, foi selecionada visando a produção de MAbs por imunização genética. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o soro policlonal anti OmpX de *S. Enteritidis* obtido por imunização genética quanto a especificidade e a capacidade de reconhecer a proteína nativa de salmonelas de diferentes sorogrupos.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Imunização dos camundongos com pcDNA3/*ompX*

A imunização genética foi baseada de acordo com Leinonen, et al (2004) com algumas modificações. Inicialmente dois camundongos da linhagem BALB/c entre 6 e 8 semanas de idade foram imunizados via intramuscular (i.m.) com 50 e 100 µg de DNA plasmideal (pcDNA/*ompX*) visando a produção de MAbs anti-OmpX via imunização genética. Trinta minutos antes de cada imunização, os camundongos receberam uma dose i.m. de 50 µl de sacarose a 25%. Foram realizadas seis inoculações com intervalos de 30 dias. Durante esse período foi retirado sangue dos camundongos por punção do plexo retro-orbital e os títulos dos anticorpos testado com a proteína de membrana externa (OmpX) nativa de diferentes sorogrupos de salmonelas e com outras enterobactérias através de ELISA indireto.

2.2 Caracterização dos MAbs por ELISA indireto

Diferentes cepas bacterianas foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) e incubadas sob agitação (200 rpm) a 37°C por 16-18 h. O material foi centrifugado por 15 min e lavado três vezes com solução de PBS estéril, pH 7,4. Para o ELISA, as células foram suspensas em tampão carbonato-bicarbonato, a DO₆₀₀ das suspensões foi ajustada a 0,6 e as mesmas foram submetidas a tratamento térmico (100°C/10 min). A reação da proteína de membrana externa recombinante (rOmpX) com o soro policlonal anti-rOmpX foi utilizado como controle positivo. (da uma olhada se é isso mesmo li rápido)

Placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 µL de cada suspensão bacteriana e as placas incubadas *overnight* a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST). O soro dos camundongos imunizados com 50 e 100 µg de DNA plasmideal (pcDNA/*ompX*) foi adicionado a placa (50 µl/cavidade) em diluições 1:50, 1:100 e 1:200 e as mesmas incubadas por 1 h a 37°C. Na sequência foi adicionado às cavidades, anticorpo de cabra anti-Ig de camundongo conjugado à peroxidase (diluído 1:3000). Após a incubação e as lavagens, a reação foi revelada com solução contendo OPD (0.4 mg/mL in 0.1 M citrate buffer, pH 5.0) e 0,03% de peróxido de hidrogênio. A placa foi mantida por 15 min no escuro e a leitura realizada a 450 nm em um leitor de ELISA (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments, Huntsville, AL, USA). Foram utilizados volumes de 50 µL de soro policlonal, conjugado e de substrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com estudos realizados recentemente, a imunização genética gera respostas fortes, altamente específicas e os MAbs produzidos geralmente reconhecem as formas nativa e recombinante da proteína (Leinonen et al., 2004; Puttikhunt et al., 2003). Entretanto, os títulos de anticorpos dos soros dos camundongos imunizados por imunização genética utilizando rOmpX e antígenos termoextraídos de salmonelas foram muito baixos. Com isso, doses adicionais do plasmídeo foram administradas na tentativa de aumentar os títulos de anticorpos para realização da fusão celular, porém sem sucesso.

O soro policlonal anti-OmpX obtido por imunização genética reconheceu a proteína de membrana externa recombinante e a nativa de diferentes sorogrupos de

salmonelas. Entretanto, o soro apresentou baixa especificidade, visto que reagiu com outras enterobactérias de importância em toxinfecções alimentares, tabela 1. Dessa forma, outro antígeno de superfície específico de salmonelas será utilizado para a produção de MAbs por imunização genética.

Tabela 1. Avaliação dos anticorpos policlonais anti-OmpX obtido por imunização genética quanto a capacidade de reconhecer a proteína nativa de salmonelas de diferentes sorogrupos e a especificidade contra diferentes bactérias.

Espécie (Sorogrupo)	Sorovar	OD ₄₅₀	
		Soro policlonal A ^b	Soro policlonal B ^c
<i>Salmonella</i>			
B	<i>S. Saint Paul</i>	0,284 ^d	0,139
C3	<i>S. Albany</i>	0,220	0,177
C2	<i>S. Infantis</i>	0,188	0,124
C3	<i>S. Dublin</i>	0,296	0,052
C2	<i>S. Hadar</i>	0,242	0,029
D1	<i>S. Enteritidis</i>	0,280	0,143
F	<i>S. Rubislaw</i>	0,198	0,088
H	<i>S. Florida</i>	0,263	0,136
<i>Enterobacter aerogenes</i>		0,190	0,101
<i>Listeria monocytogenes</i>		0,023	0,029
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		0,190	0,116
<i>Serratia marcescens</i>		0,192	0,134

^a Suspensão de células lavadas, diluídas a DO₆₀₀ de 0,6 em 0,05M de tampão carbonato bicarbonato (pH 9,6) e submetidas a tratamento térmico (100°C/10 min) foram usadas como antígeno para sensibilizar as placas para o ELISA Indireto.

^b Soro do camundongo imunizado com doses de 50 µg de pcDNA3/*ompX* diluído 1:50.

^c Soro do camundongo imunizado com doses de 100 µg de pcDNA3/*ompX* diluído 1:50.

^d Média de duplicatas.

4. CONCLUSÕES

Os anticorpos policlonais anti-OmpX de *S. Enteritidis* dos camundongos imunizados via genética apresentaram baixos títulos e baixa especificidade. Frente a esse resultado novos protocolos de imunização serão avaliados buscando melhorar os títulos de anticorpos para realização da fusão celular. Além disso, outro antígeno de superfície específico de salmonelas será utilizado para a produção de MAbs por imunização genética.

5. AGRADECIMENTO

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARDOZO, R. M.; MARTINS, N. R. S.; RESENDE, J. S.; RESENDE, M.; TEIXEIRA, A. A. P.; JORGE, M. A.; SOUZA, M. B.; EIPHANIO, E. O. B. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra o vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53 n°3, 2001.

LEINONEN, J.; NIEMELÄ, P.; LÖVGREN, J.; BOCCHI, L.; PETTERSSON, K.; NEVANLINNA, H.; STENMAN, U-H. Characterization of monoclonal antibodies against prostate specific antigen produced by genetic immunization. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, p. 157-167, 2004.

MOREIRA, A. N., D. S. **Development of immunological and molecular methods for detection of salmonella in foods**, Pelotas, 2005, 65 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola), Universidade Federal de Pelotas, 2005.

PUTTIKHUNT, C.; KASINRERK, W.; SRISA-AD, S.; DUANGCHINDA, T.; SILAKATE, W.; MOONSOM, S.; SITTISOMBUT, N.; MALASIT, P. Production of anti-dengue NS1 monoclonal antibodies by DNA immunization. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 55-66, 2003.

REIS, R. B., MAMIZUKA, E. M., FRANCO, B. D. G. M.. Production of immunoreagents to be used in a enzyme immunoassay for detection of *Salmonella*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 261-266, 2001.

RODRIGUES, L.B. **Levantamento sorológico e detecção de *Salmonella* em granjas de postura comercial de pequeno porte em um município do Estado do Rio Grande do Sul**. 2002. 88 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

TANG, D., DEVIT, M., JOHNSTON, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, v. 356, p. 152-154, 1992.