

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE MEMBRANA EXTERNA DE SALMONELAS NÃO REAGEM COM A PROTEÍNA NATIVA

**CONRAD, Neida Lucia³; SEHN, Carla Pohl¹; De CARLI, Eduardo³; BANDEIRA,
Rafaela Oliveira⁴; MENDONÇA, Marcelo¹; DA HORA, Vanusa Pousada¹;
MOREIRA, Ângela Nunes^{1,2}; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo¹; ALEIXO, José
Antonio Guimarães¹**

1 Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - UFPel

2 Faculdade de Nutrição – UFPel

3 Bolsista CNPq/UFPel

4 Bolsista BIC/FAPERGS

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

neidaconrad@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

O método de detecção convencional de salmonelas, um dos principais agentes causadores de doenças de origem alimentar em diversos países e responsável por significativas perdas econômicas (Nadvorny et al, 2004), é baseado no isolamento da bactéria em meios seletivos e posterior identificação bioquímica e sorológica. Devido às suas limitações e, principalmente, ao longo período de tempo requerido para a detecção de salmonelas em alimentos (4 - 7 dias), diversos métodos rápidos vêm sendo propostos nos últimos anos (Ferretti et al., 2001). Os métodos baseados na especificidade da reação antígeno-anticorpo geralmente apresentam facilidade de execução e rapidez na obtenção de resultados quando comparados à metodologia convencional de detecção (Moreira, 2005). Entretanto, sua sensibilidade e especificidade dependem dos anticorpos utilizados. Anticorpos monoclonais (MAbs) contra antígenos de superfície específicos de salmonelas têm sido utilizados e aumentado a especificidade desses métodos. MAbs devem apresentar alta afinidade pelo antígeno selecionado como alvo e não apresentar reações inespecíficas com outros antígenos (Boenisch, 2003).

Visando sua utilização em métodos imunológicos de detecção de salmonelas em alimentos, MAbs foram produzidos contra a proteína de membrana externa OmpX, uma proteína codificada por um gene constituinte de uma ilha de patogenicidade importante para infecções sistêmicas e conservado entre salmonelas (Pattery et al., 1999). O presente estudo teve por objetivo caracterizar os MAbs anti OmpX quanto a sua capacidade de reconhecer a proteína nativa de salmonelas de diferentes sorogrupos e quanto a sua especificidade.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção dos MAbS e cepas bacterianas

Os dois MAbS avaliados (54F e 36C) foram obtidos em uma fusão celular realizada de acordo com as recomendações de Harlow & Lane (1988), utilizando a proteína OmpX recombinante (rOmpX) como antígeno de imunização. Para avaliar a capacidade dos MAbS obtidos reconhecerem a proteína nativa e avaliar sua especificidade, diferentes sorovares de salmonelas e outras bactérias (Tabela 1) foram utilizados como antígenos em um ELISA indireto e *Western blot*.

Tabela 1. Sorovares de salmonelas e outras bactérias utilizadas na caracterização de MAbS anti rOmpX.

Sorovares de salmonelas	Bactérias
<i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis	<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Salmonella</i> Rubilslaw	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Salmonella</i> Saint Paul	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Salmonella</i> Albany	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Salmonella</i> Infantis	
<i>Salmonella</i> Dublin	
<i>Salmonella</i> Hadar	
<i>Salmonella</i> Florida	

2.2 Caracterização dos MAbS por ELISA indireto

As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo Luria Bertani (LB) e incubadas sob agitação (200rpm) à 37°C por 16-18h. Os cultivos foram centrifugados por 15 min e lavados três vezes com PBS estéril, pH 7,4. As células foram suspensas em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,0), de forma a obter a DO₆₀₀=0,6, e submetidas a tratamento térmico (100°C/10min). Como controle da reação, foram utilizados rOmpX e soro policlonal anti rOmpX.

Cavidades de placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 µL de cada suspensão bacteriana e as placas incubadas por 16-18 h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Sobrenadantes dos cultivos dos hibridomas secretores dos MAbS foram adicionados às cavidades e as placas incubadas por 1 h a 37°C. Após nova série de lavagens, anticorpo de cabra anti-Ig de camundongo conjugado à peroxidase (diluído 1:2000) foi adicionado às cavidades. Após nova incubação e lavagem das placas, o substrato da enzima-cromógeno (H₂O₂/OPD) em tampão citrato-fosfato foi adicionado. A reação ocorreu no escuro por 10 min e a leitura da densidade óptica a 450 nm foi realizada em espectrofotômetro. Foram utilizados volumes de 50 µL de conjugado e de substrato.

2.3 Caracterização dos MAbS por Western-blot

Os cultivos das cepas bacterianas em caldo LB foram centrifugados e as células lavadas três vezes em PBS estéril. Cada *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS e sonificado 3 vezes durante 30 s. As suspensões foram submetidas à SDS-PAGE e as proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose para realizar a reação com os MAbS. A membrana foi bloqueada *overnight* com 5% de leite em pó desnatado diluído em PBS-T e incubada por 1 h com 100 µL dos sobrenadantes dos cultivos dos hibridomas secretores dos MAbS. Após, a membrana foi incubada por 1

h com anticorpo de cabra anti-Ig de camundongo conjugado à peroxidase (diluído 1:2000 em PBS-T). As etapas foram realizadas à temperatura ambiente e a membrana foi submetida a três lavagens durante 5 min com PBS-T entre cada etapa. O desenvolvimento de cor ocorreu após a adição do substrato da enzima/cromógeno (H₂O₂/DAB).

3. RESULTADOS

Foram utilizados ELISA indireto e *Western blot* para avaliar a capacidade de MAbs anti rOmpX reconhecerem esta proteína na sua forma nativa, usando salmonelas de diferentes sorogrupos, e testar sua especificidade usando diferentes enterobactérias (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação dos MAbs anti-OmpX e soro policlonal anti-OmpX na capacidade de reconhecer a proteína nativa de salmonelas de diferentes sorogrupos e a especificidade contra diferentes enterobactérias.

Espécie (Sorogrupo ^a)	Sorovar	MAB 36C	Mab 54F	Policlonal anti-OmpX
<i>Salmonella</i>				
B	S. Saint Paul	N	N	P
C3	S. Albany	N	N	P
C2	S. Infantis	N	N	P
C3	S. Dublin	N	N	P
C2	S. Hadar	N	N	P
D1	S. Enteritidis	N	N	P
F	S. Rubislaw	N	N	P
H	S. Florida	N	N	P
<i>Enterobacter aerogenes</i>		N	N	P
<i>Listeria monocytogenes</i>		N	N	P
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		N	N	P
<i>Serratia marcescens</i>		N	N	P
<i>Escherichia coli</i>		N	N	P

^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. N indicando reação negativa e P indicando reação positiva.

Foi verificado que os dois MAbs testados não reagiram com os diferentes sorovares de salmonelas e nem com outras enterobactérias. No entanto, nos dois ensaios utilizados, o soro policlonal anti rOmpX reagiu especificamente com as salmonelas. Esses resultados mostram que embora rOmpX tenha sido capaz de estimular nos animais a produção de anticorpos que reagem especificamente com a forma nativa da proteína, o mesmo não aconteceu com os MAbs obtidos nesta fusão celular. Isto pode ter sido devido às salmonelas não estarem expressando OmpX no cultivo utilizado, ou aos epitopos não estarem acessíveis aos MAbs na forma nativa da proteína.

4. CONCLUSÃO

Os MAb's anti rOmpX, obtidos a partir de animais imunizados com a proteína recombinante, não reagiram com diversos sorovares de salmonelas e, portanto, não servem para o desenvolvimento de testes imunológicos de detecção destas bactérias em amostras de origem clínica ou ambiental. A reação observada com o soro dos animais imunizados com rOmpX sugere que a proteína é imunogênica porém, apresentou reação cruzada com as demais enterobactérias testadas, sugerindo que este alvo não é ideal para a produção de anticorpos a serem utilizados em imunoenaios. Um novo alvo já foi selecionado e clonado, visando sua utilização na produção de MAb's contra proteína fimbrial principal de *S. Enteritidis* (FimA) via imunização clássica e via imunização genética para fins de comparação dos MAb's obtidos futuramente.

5. AGRADECIMENTO

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 100836/2009-9 pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOENISCH, T. (Ed.) **Immunochemical Staining Methods**, 3ª ed., Califórnia: Dako, 2001.

FERRETI, R.; MANNAZZU, L.; COCOLIN, I.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based Method for Detection of *Salmonella* spp. In food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 977-978. 2001.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 726 p., 1988.

MOREIRA, A.N **Development of immunological and molecular methods for detection of *Salmonella* in foods**. Pelotas, 2005, Dissertação (Doutorado em Biotecnologia Agrícola), Universidade Federal de Pelotas, 2005.

NADVORNY A. FIGUEIREDO D.M.S. & SCHMIDT V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul, em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 47-51, 2004.

PATTERY, T.; HERNALSTEENS, J. P.; DE GREVE, H. Identification and molecular characterization of a ovel *Salmonella enteritidis* pathogenicity islet encoding an ABC transporter. **Molecular Microbiology**, v. 33, 4, p. 791-805, 1999.