



## **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA A PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA OmpX DE *Salmonella***

**CONRAD, Neida Lucia<sup>1</sup>; De CARLI, Eduardo<sup>1</sup>; MENDONÇA, Marcelo<sup>2</sup>; DA HORA, Vanusa<sup>2</sup> Pousada; SENH, Carla Pohl<sup>2</sup>; MOREIRA, Ângela Nunes<sup>2,3</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo<sup>3</sup>; ALEIXO, José Antonio Guimarães<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Bolsista CNPq/UFPeI;

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;

<sup>3</sup>Faculdade de Nutrição – UFPeI

Campus Universitário – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900, neidaconrad@yahoo.com.br

### **1. INTRODUÇÃO**

Bactérias do gênero *Salmonella* são responsáveis por sérios problemas de saúde pública e significativas perdas econômicas, sendo reconhecidas como um dos principais agentes de infecção alimentar em diversos países (NADVORNY *et al.*, 2004). No Rio Grande do Sul, *Salmonella* tem sido reconhecida como o principal microrganismo responsável por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) na última década (COSTALUNGA *et al.*, 2002).

A metodologia convencional para detecção de salmonelas em alimentos é baseada no isolamento destas bactérias em meios seletivos e posterior identificação bioquímica e sorológica. Esta metodologia além de requerer um longo período para ser completada (4 a 7 dias), também se torna onerosa devido ao material e mão de obra envolvidos (FERRETTI *et al.*, 2001). Nos últimos anos diversos métodos rápidos têm sido propostos para a detecção de salmonelas em alimentos, dentre os quais estão os baseados na especificidade da reação antígeno-anticorpo. Anticorpos monoclonais (MAbs) contra antígenos estruturais específicos de salmonelas, como por exemplo, contra uma proteína flagelar (VRIES *et al.*, 1998) lipopolissacarídeo (LPS) (NG *et al.*, 1996) e proteína fimbrial (THORNS *et al.*, 1994), têm sido utilizados e aumentam a especificidade destes métodos.

A proteína de membrana externa OmpX, codificada por um gene constituinte de uma ilha de patogenicidade importante para infecções sistêmicas e conservado entre salmonelas (PATTERY *et al.*, 1999), foi selecionada para ser utilizada na produção de MAbs, por ser um antígeno de superfície específico de salmonelas. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo a produção de MAbs anti-OmpX utilizando a proteína recombinante como antígeno, visando sua futura utilização em métodos de detecção de salmonelas em amostras de alimentos.

### **2. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **2.1 Protocolo de imunização**

Dois camundongos da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade foram imunizados via intraperitoneal (i.p.) com 100 µg da proteína recombinante OmpX (rOmpX) e igual volume de adjuvante de Freund completo. Foram realizadas mais 4 imunizações com intervalos de 15 dias entre elas, utilizando adjuvante de Freund incompleto e, uma semana após a última imunização, foi feita uma titulação de anticorpos do soro através de um ELISA indireto, utilizando rOmpX como antígeno. O camundongo com título mais alto recebeu nova dose de antígeno via i.p., uma dose da proteína recombinante via endovenosa (aproximadamente 50 µg) e, após três dias, foi eutanasiado para obtenção dos esplenócitos para realização da fusão com as células de mieloma.

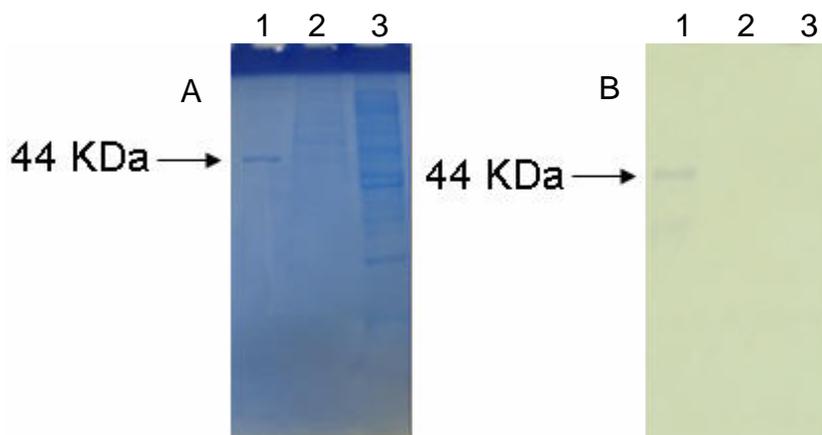
## 2.2 Produção e caracterização inicial dos MAbs

A obtenção dos MAbs foi realizada de acordo com as recomendações de Harlow & Lane (1988). Resumidamente, esplenócitos do camundongo imunizado e células de mieloma da linhagem SP2/0 foram misturadas numa proporção 1:10 e induzidas à fusão com solução de polietilenoglicol a 50%. As células foram ressuspendidas em DMEM-HAT contendo 10% de soro fetal bovino e a suspensão foi distribuída em placas de cultivo de células que foram incubadas a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As cavidades que apresentaram bom crescimento de células foram testadas através de um ELISA indireto usando rOmpX como antígeno para verificar a produção de anticorpos. Os hibridomas que apresentaram boa atividade de anticorpos foram clonados duas vezes pela técnica da diluição limitante (CAMPBELL, 1991), expandidos, retestados e congelados em nitrogênio líquido.

Para avaliar se os MAbs obtidos reconhecem a proteína nativa, foi realizado um ELISA indireto e um *Western blot* e, para avaliar a especificidade dos MAbs, foi realizado um ELISA indireto. No ELISA, os MAbs foram testados utilizando, como antígenos, preparados de células bacterianas vivas e inativadas por calor de cultivos overnight das cepas de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* (ATCC 13076), *E.coli* e *L. monocytogenes* e no *Western blot*, de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos dois hibridomas secretores de MAbs que reagem com a proteína de membrana externa OmpX recombinante. Os MAbs não reagiram com células bacterianas vivas e inativadas por calor da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* avaliadas, tanto no ELISA indireto quanto no *Western blot* (Fig. 1).



**Figura 1.** Avaliação da reatividade dos MAbs anti-rOmpX com preparados de células bacterianas vivas e inativadas por calor de cepas de salmonelas. (A) SDS-PAGE 12% e (B) *Western blot*. 1- rOmpX; 2- *S. Enteritidis* (ATCC 13076); 3- *S. Typhimurium*.

Esses resultados sugerem que as bactérias testadas não estão expressando a proteína OmpX, ou os MAbs obtidos não reconhecem a OmpX expressa por essas cepas avaliadas, ou os MAbs não reconhecem a proteína OmpX de salmonelas em sua forma nativa. Com isso, novos estudos serão realizados utilizando salmonelas de outros sorotipos.

Com relação à especificidade, os MAbs também não reagiram com as células bacterianas vivas nem inativadas de nenhuma das bactérias avaliadas, o que indica uma boa especificidade. Entretanto, foram utilizados somente 2 bactérias de outros gêneros. Dessa forma, será necessário avaliar a especificidade desses MAbs utilizando células vivas e inativadas de outras bactérias.

#### 4. CONCLUSÕES

Foram obtidos 2 MAbs que reagem com a proteína OmpX recombinante (rOmpX) de salmonelas. Os MAbs apresentaram boa especificidade, entretanto não reagiram com a *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* avaliadas. Dessa forma, os MAbs obtidos serão avaliados quanto à sua especificidade com salmonelas de diferentes sorogrupos e com outras enterobactérias.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMPBELL, A. M. **Monoclonal and immunosensor technology**. Amsterdam: Elsevier, 1991.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 to 1999. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 342-346, 2002.

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.

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

NG, S.P.; TSUI, C.O.; ROBERTS, D.; CHAU, P.Y.; NG, M.H. Detection and serogroup differentiation of Salmonella spp. In food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 monoclonal antibody capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, 7, p. 2294-2302, 1996.

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.

THORNS, C.J.; McLAREN, I.M.; SOJKA, M.G. The use of latex particle agglutination to specifically detect *Salmonella enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 47-53, 1994.

VRIES, N.; ZWAAGSTRA, K.A.; VELD, F.K.; VAN ZIJDERVELD, F.G; KUSTERS, J.G. Production of monoclonal antibodies specific for the *i* and 1,2 flagellar antigens of Salmonella Typhimurium and characterization of their respective epitopes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 38, 12, p. 4402-4407, 2000