

XVIII

CIC

XI ENPOS  
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:  
por uma ciência do devir



## CONFIRMAÇÃO RÁPIDA DE *Listeria monocytogenes* UTILIZANDO WESTERN BLOT E ANTICORPO MONOCLONAL ESPECÍFICO

**CONRAD, Neida Lucia<sup>3,5</sup>; MENDONÇA, Marcelo<sup>1,2</sup>; PRATES, Denise da Fontoura<sup>2</sup>; LANSINI, Valmor<sup>2</sup>; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo<sup>1</sup>; MOREIRA, Ângela Nunes<sup>3,4</sup>; SILVA, Wladimir Padilha da<sup>1,2</sup>; ALEIXO, José Antonio Guimarães<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFPel

<sup>2</sup> Lab. Microbiologia de Alimentos, Dep. Ciência e Tecnologia Agroindustrial - FAEM / UFPel

<sup>3</sup> Centro de Biotecnologia - UFPel

<sup>4</sup> Faculdade de Nutrição - UFPel

<sup>5</sup> Bolsista CNPq/UFPel

UFPel - Campus Universitário s/n, Lab. de Imunologia Aplicada/ Cenbiot, Cep: 96010-900  
neidaconrad@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Listeria* é constituído por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*, das quais, *L. monocytogenes* é a única patogênica ao homem, causando a listeriose (Cossart, 2007). O método bioquímico convencional para confirmação de colônias de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos requer um longo período para ser completado (7 a 9 dias) e é oneroso em função do material e mão-de-obra envolvidos (Hudson et al., 2001). Na tentativa de buscar métodos mais rápidos e sensíveis de identificação, os anticorpos monoclonais (MAbs) vêm sendo amplamente utilizados. O principal alvo dos MAbs usados nestes métodos são as de proteínas da membrana externa (Tully et al. 2008). Dentre as diversas proteínas da parede celular e fatores de virulência de *L. monocytogenes*, a proteína Internalina A (InlA) é uma das mais bem caracterizadas, sendo exclusiva desta espécie (Bierne et al., 2007). Esta proteína está covalentemente ancorada na superfície de *L. monocytogenes*, e é essencial para a sua adesão e internalização na célula hospedeira (Schubert et al., 2002).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a viabilidade de fazer a confirmação rápida de *L. monocytogenes* a partir de colônias suspeitas, utilizando a técnica *Western blot* (WB) com um MAb anti-InlA (MAb 3C5) produzido no Laboratório de Imunologia Aplicada do Cenbiot/UFPel.

### 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram escolhidas oito colônias com características morfológicas típicas do gênero *Listeria*, denominadas colônias A, B, C, D, E, F, G e H, isoladas em ágar Palcam e Oxford (Oxoid).

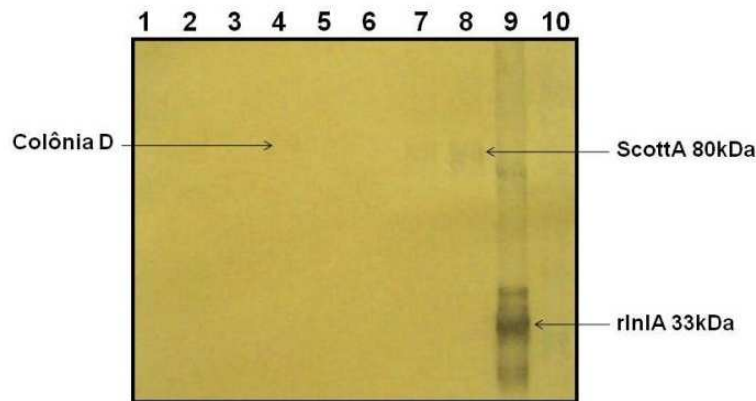
As colônias foram repicadas em 10 mL de Caldo UVM de Enriquecimento para *Listerias* (LEB, Difco) para o WB e, simultaneamente, foram repicadas em TSA-YE para confirmação bioquímica, a qual foi realizada segundo método proposto por FARBER et al. (1994). O caldo LEB foi incubado a 37°C por 18 h e, após, os cultivos foram centrifugados e lavados 3 vezes, e ressuspensos em 1 mL de PBS 1X. Todos os cultivos foram ajustados para a mesma concentração ( $DO_{600} = 1,5$ ) e as células contidas em 1 mL foram recuperadas por centrifugação; a seguir, o precipitado foi ressuspensado em 80  $\mu$ L de PBS 1X e sonificado por 3 vezes durante 10 segundos. O lisado de células foi acrescido de 20% de tampão 5X SDS/ $\beta$ -mercaptoetanol e fervido por 10 min. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) a 10%, utilizando-se 15  $\mu$ L em cada cavidade. Em seguida as células foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) por 1,5 h com a fonte ajustada para diferença de potencial elétrico (DDP) de 100 V. Após, a membrana foi bloqueada por 1h com 5% de leite em pó desnatado diluído em PBS 1X.

O MAb anti-InIA 3C5 diluído 1:500 em PBS 1X foi adicionado sobre a membrana, a seguir, o complexo antígeno-anticorpo foi detectado utilizando anticorpos polivalentes de cabra anti-camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:2000 em PBS 1X. Para a visualização das bandas a membrana foi colocada em solução cromógena contendo DAB (tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina). Todas as reações dos anticorpos foram realizadas em temperatura ambiente sob agitação orbital por 1 h, e entre cada etapa a membrana foi lavada por 3 vezes com PBS-T.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oito colônias com características morfológicas típicas de *L. monocytogenes* em meios Palcam e Oxford foram testadas por *Western blot* com o MAb 3C5. Apenas duas colônias apresentaram uma banda de aproximadamente 80 kDa, reação compatível para a massa molecular esperada da proteína InIA nativa. Estas duas colônias foram confirmadas como *L. monocytogenes* pelo método convencional. As outras seis colônias, que não apresentaram a referida banda com o anticorpo testado, foram confirmadas como *L. innocua*. Esses resultados demonstram a especificidade do MAb 3C5 na detecção de *L. monocytogenes*.

Na figura 1 são demonstradas as reações no *Western blot* com as colônias testadas onde se observa reações positivas nas colunas 4 (colônia D), 7 (colônia G), 8 (controle positivo - cepa padrão ScottA, sorotipo 4b), e 9 (proteína rInIA de 33 kDa). É importante ressaltar que não houve reação do MAb 3C5 com a colônia H (dados não mostrados).



**Figura 1.** *Western blot* utilizando MAb anti-InIA 3C5. Coluna 1- Colônia A; Coluna 2- Colônia B; Coluna 3- Colônia C; Coluna 4- Colônia D; Coluna 5- Colônia E; Coluna 6- Colônia F; Coluna 7- Colônia G; Coluna 8- cepa padrão ScottA; 9- rInIA; Coluna 10- Marcador de proteína pré-corado (Invitrogen).

O tempo total para a confirmação de *L. monocytogenes* utilizando a técnica de *Western blot* com o MAb 3C5, após as colônias serem selecionadas e incluindo o tempo de enriquecimento em LEB, foi de aproximadamente 30 h, o qual é muito inferior ao requerido pela técnica convencional. Além disso, foi possível minimizar drasticamente os diversos meios de cultura e mão-de-obra requeridas para a confirmação bioquímica deste microrganismo.

Atualmente, alguns grupos de pesquisa vêm utilizando a técnica de *Western blot*, com o emprego de MAbs como insumo, para identificação específica de patógenos como *Campylobacter jejuni* (Qian et al., 2008) e *Rickettsia* spp. (Balraj et al., 2008).

#### 4. CONCLUSÃO

A técnica *Western blot* com o MAb anti-InIA 3C5 demonstrou ser viável e específica, apresentando potencial para utilização na rápida confirmação de *L. monocytogenes* isoladas a partir de alimentos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALRAJ, P; NAPPEZ, C; RAOULT, D; RENESTO, P. Western-blot detection of RickA within spotted fever group rickettsiae using a specific monoclonal antibody. **FEMS Research Letter**, v. 286, p. 257-262, 2008.

BIERNE, H.; SABET, C.; PERSONNIC, N.; COSSART, P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection**, v. 9, p.1156-1166, 2007.

COSSART, P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1143-1146, 2007.

FARBER, J. M.; WARBURTON, D. W.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. **Government of Canada - HPB Method**, Quebec (Canada): Polyscience Publications, Sep. 1994.

HUDSON J. A.; LAKE, R. J; SAVILL, M. G.; SCHOLES, P.; MCCORMICK, R. E. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, 614-621, 2001.

QIAN, H.; PANG E; DU, Q.; CHANG, J.; DONG, J; TOH, S. L; NG F., TAN, A. L., KWANG, J. Production of a Monoclonal Antibody Specific for the Major Outer Membrane Protein of *Campylobacter jejuni* and Characterization of the Epitope. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 833-839, 2008.

SCHUBERT W. D.; URBANKE, C.; ZIEHM T.; ET AL. HEINZ D. W. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with Its Human Receptor E-Cadherin. **Cell**, v. 111, 825-836, 2002.

TULLY, E.; HIGSON, S. P.; O'KENNEDY, R. The development of 'labelless' immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface protein Internalin B. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 906-912, 2008.