

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

**Anticorpos policlonais contra InvH de *Salmonella* spp.:
produção, caracterização e aplicação em separação
imunomagnética**

Caroline de Paula Lopes

Pelotas, 2012

CAROLINE DE PAULA LOPES

Anticorpos policlonais contra InvH de *Salmonella* spp.: produção, caracterização e aplicação em separação imunomagnética

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento Microbiologia de Alimentos).

Orientadora: Ângela Nunes Moreira

Co-orientador (es): Fabrício Rochedo Conceição

Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

L864a Lopes, Caroline de Paula

Anticorpos policionais contra InvH de Salmonella spp : produção, caracterização e aplicação em separação imunomagnética / Caroline de Paula Lopes ; orientador Ângela Nunes Moreira; co-orientadores Fabrício Rochedo Conceição e Wladimir Padilha da Silva - Pelotas,2012.-80f. : il.- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Salmonella spp. 2.Doenças 3.Alimentos
4.Imunodiagnóstico 5.Diagnóstico rápido I.Moreira, Ângela Nunes(orientador) I.Título.

CDD 574.2322

Banca examinadora:

Prof. Dr. Alan John Alexander McBride, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Marcelo Mendonça, Universidade Federal de Pelotas

DEDICATÓRIA

Dedico a Eduardo Schaaf Corrêa e a meu pai José Hugo Sabeda Lopes

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de aprendizado, em especial, ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico – Biotecnologia pela acolhida e possibilidade de desenvolvimento do meu projeto.

Ao meu noivo Eduardo Schaaf Corrêa, por todo amor, companheirismo, incentivo e compreensão, fundamentais nessa etapa, necessários por toda minha vida. Palavras não capazes de expressar todo o afeto que tenho por ti. Muito obrigado!

Aos meus pais, Nair e José Hugo, pelo incalculável apoio e investimento de uma vida inteira, por vezes abdicando de suas vontades em detrimento dos meus objetivos, obrigado pelo incentivo e amor incondicional.

Aos meus irmãos Alexandra e Tiago, minha sobrinha Rafaella, agradeço por estarem sempre ao meu lado em todas as decisões e etapas da minha vida. Vocês são o meu DNA.

Aos meus sogros, Suzana e Clésio, pelo incentivo e conselhos imensuráveis.

À minha orientadora Ângela Moreira e ao Prof. Fabrício Conceição pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada, Rodrigo, Flávia, Leonardo, Vanessa, Regina, Neida, Marcelle, Michele, Carla, Marcelo pela excelente convivência, incentivo, ensinamentos e mais que tudo, pela amizade, vocês com certeza tornaram mais fácil essa caminhada!

A minha estagiária, fiel escudeira, Suely Bampi, tua participação foi essencial no desenvolvimento deste projeto, muito obrigada pelo carinho, amizade, confiança e dedicação.

Aos estagiários, Carlos Eduardo e Gustavo pela valiosa ajuda em diversos momentos críticos deste trabalho, e aos demais estagiários do laboratório, agradeço por toda ajuda e pelos ótimos momentos de convivência e amizade!

Aos demais colegas, estagiários e amigos do Mestrado e da Biotecnologia obrigado pelo convívio, apoio e amizade.

A todos os meus amigos, os de longe e de perto, agradeço pelo suporte indispensável que é a amizade. Obrigado por fazerem parte de alguma forma da minha vida.

Resumo

LOPES, Caroline de Paula. **Anticorpos policlonais contra InvH de *Salmonella* spp.: produção, caracterização e aplicação em separação imunomagnética.** 2012. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Infecções alimentares ocasionadas por bactérias do gênero *Salmonella* spp. são de extrema relevância em todo o mundo, pois, além de causarem elevadas taxas de morbidade e do patógeno ser de difícil controle, as salmoneloses acarretam importantes perdas econômicas para a indústria de alimentos. A metodologia convencional para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos é laboriosa e onerosa, exigindo um longo tempo de análise, bem como, diversas etapas para a identificação final da bactéria. Imunoensaios para a detecção mais rápida desse patógeno tem sido desenvolvidos, e, dentre esses métodos, destacam-se as técnicas de ELISA, *Western Blotting* e a separação imunomagnética (IMS). Neste trabalho é relatada a busca por um novo alvo, a produção e a caracterização de anticorpos policlonais (PABs) contra *Salmonella* spp. , associando a IMS, utilizando microesferas sensibilizadas com o PABs anti-rInvH, a PCR, para a detecção da bactéria em cultivos puros. Para a pesquisa e a seleção do alvo, ferramentas de bioinformática foram utilizadas, e a proteína *Cell adherence-invasion protein* (InvH) foi escolhida. Para a produção dos PABs, camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína recombinante (rInvH) expressa em *Escherichia coli*. Foi observado através de ELISA indireto e *Western Blotting*, que os PABs anti-rInvH foram capazes de reconhecer todas as cepas de *Salmonella* spp. avaliadas, entretanto, também reagiram inespecificamente com outras proteínas de salmonelas e com *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Proteus* sp. Com a utilização do PABs anti-rInvH na sensibilização das microesferas para a IMS associada a PCR, foi possível capturar *Salmonella* Typhimurium a partir de cultivos puros em 6 h, com um limite de detecção de 10^4 UFC.mL⁻¹. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram o potencial da proteína InvH de *Salmonella* spp. como um alvo em potencial para o desenvolvimento de anticorpos monoclonais e posterior utilização destes em imunoensaios diagnósticos para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos.

Palavras chave: *Salmonella* spp.. Doenças transmitidas por alimentos. Imunodiagnóstico. Diagnóstico rápido.

Abstract

LOPES, Caroline de Paula. **Polyclonal antibodies against *Salmonella* spp. InvH: production, characterization and application in immunomagnetic separation.** 2012. 73 f. Thesis (Master Degree) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Foodborne illness caused by *Salmonella* spp. are extremely important around the world. In addition to causing high morbidity, as well as being difficult to control, *Salmonella* spp. also causes significant economic losses for the food industry. Conventional methods for detection of *Salmonella* spp. in foods are laborious and expensive, requiring a long time for analysis, as well as several steps for final identification of bacteria. Immunoassays for the rapid detection of *Salmonella* spp. have been developed, including ELISA, *Western Blotting* and immunomagnetic separation (IMS). This work describes the search for a new target, the production and characterization of polyclonal antibodies (PABs) against *Salmonella* spp., combining the IMS using beads coated with the anti-rInvH PABs, and PCR for detection of bacteria in pure cultures. In order to identify and select the target gene bioinformatics tools were used and the protein Cell adherence-invasion (InvH) was selected. For PABs production, BALB/c mice were immunized with recombinant protein (rInvH) expressed in *Escherichia coli*. By indirect ELISA and *Western blotting* it was observed, that the anti-rInvH PABs were able to recognize all the *Salmonella* spp. strains evaluated. However, the anti-rInvH PABs also reacted nonspecifically with other proteins from *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* and *Proteus* sp. Using beads coated with anti-rInvH PABs to the IMS associated with PCR was possible to capture *Salmonella* Typhimurium from pure cultures in 6 h, with a detection limit of 10^4 CFU.mL⁻¹. The results of this study demonstrated the potential of the InvH protein as a potential target for the development of monoclonal antibodies. Furthermore, this protein may also be subsequently used in diagnostic immunoassays for the detection of *Salmonella* spp..

Keywords: *Salmonella* spp.. Foodborne. Immunoassays. Rapid diagnosis.

Lista de Figuras

Figura 1	Resultados simplificados do alinhamento, no programa EMBOSS Needle, das proteínas pré-selecionadas <i>Host colonization factor</i> (ShdA), <i>AIDA transporter-like protein</i> (AIDA) e <i>Cell adherence-invasion protein</i> (InvH) com a primeira e última sequências protéicas de <i>E.coli</i> identificadas no alinhamento BLASTp.	47
Figura 2	Resultado da predição de acessibilidade de superfície da sequência da proteína <i>Cell adherence-invasion protein</i> (InvH) de <i>Salmonella</i> spp. através do programa Emini.....	49
Figura 3	Resultado da análise da sequência da proteína <i>Cell adherence-invasion</i> (InvH) de <i>Salmonella</i> spp. através do programa BepiPred.....	50
Figura 4	Resultados simplificados do alinhamento múltiplo, no programa Clustal Omega, da proteína <i>Cell adherence-invasion protein</i> (InvH) com a primeira e última sequências protéicas de <i>E.coli</i> identificadas no alinhamento BLASTp.	51
Figura 5	Mapa representativo do vetor recombinante pAE/ <i>invH</i> obtido através do software VectorNTI 9.1.	55
Figura 6	Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial extraído, através do método de lise rápida “microprep”, das colônias de <i>E. coli</i> BL21(DE3)Top10 suspeitas de serem recombinantes (conterem o plasmídeo pAE/ <i>invH</i>).	56
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da digestão do DNA plasmidial, extraído dos clones de <i>E. coli</i> BL21(DE3)Top10 suspeitos de serem recombinantes, com as enzimas de restrição <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI utilizadas na clonagem.....	57
Figura 8	SDS-PAGE 15% da expressão em pequena escala da proteína recombinante rInvH em cepas de <i>E. coli</i> STAR e <i>E.coli</i> pLyss.....	57
Figura 9	<i>Western Blotting</i> da expressão em pequena escala da proteína recombinante rInvH em cepas de <i>E. coli</i> STAR e <i>E.coli</i> pLyss	58
Figura 10	SDS-PAGE 15% dos anticorpos policlonais (PABs) anti-rInvH purificados.....	59

Figura 11	Curva de titulação do PAbs anti-rInvH (3,4 mg.mL ⁻¹ , diluído em base dois de 1:500 a 1:1024000) através de ELISA indireto utilizando 100 ng de rInvH como antígeno.....	60
Figura 12	Reatividade do PAbs anti-rInvH (3,4 mg.mL ⁻¹ , diluído 1:1000), avaliada através de ELISA indireto, com extrato protéico de cepas de salmonelas e de outras bactérias (cultivos de 12 h com D.O ₆₀₀ ajustada a 1,0).....	61
Figura 13	Reatividade do PAbs anti-rInvH (3,4 mg.mL ⁻¹ , diluído 1:1000) , avaliada através de <i>Western blotting</i> , com extrato protéico de cepas de salmonelas e de outras bactérias (cultivos de 12 h com D.O ₆₀₀ ajustada a 1,0).....	64
Figura 14	Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos amplificados com o <i>primer invH</i> e DNAs de <i>S. Typhimurium</i> capturadas pelas microesferas a partir do cultivo puro.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1	Bactérias utilizadas nos experimentos para avaliar a capacidade dos anticorpos policlonais reconhecerem a proteína nativa e da sua especificidade e para avaliar a IMS associada a PCR.	30
Tabela 2	Resultados parciais do alinhamento, no programa BLASTp, das proteínas pré selecionadas <i>Host colonization factor</i> (ShdA), <i>AIDA transporter-like protein</i> (AIDA) e <i>Cell adherence-invasion protein</i> (InvH) com a primeira e última sequências protéicas de <i>E.coli</i> identificadas no alinhamento	45
Tabela 3	Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do fragmento da região codificadora do gene <i>invH</i> para a obtenção de rInvH e enzimas de restrição utilizadas na clonagem.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 <i>Salmonella</i> spp. e as Doenças Transmitidas por Alimentos.....	17
3.2 Metodologia Convencional de Isolamento e Identificação de <i>Salmonella</i> spp.	23
3.3 Separação imunomagnética (IMS) associada a PCR	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Bactérias, condições de cultivo e extração de DNA	30
4.2 Seleção <i>in silico</i> de proteínas alvos para produção de anticorpos contra <i>Salmonella</i> spp.	31
4.3 Clonagem do fragmento da região codificadora do gene selecionado no vetor de expressão em <i>E. coli</i> pAE	33
4.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e amplificação por PCR do fragmento da região codificadora do gene selecionado	33
4.3.2 Clonagem do gene selecionado no vetor pAE	34
4.4 Expressão da proteína recombinante InvH (rInvH)	35
4.5 Purificação da proteína recombinante	36
4.6 Produção de anticorpos policlonais (PAbs)	37
4.7 Caracterização dos PAbs	38
4.7.1 Titulação dos PAbs.....	38
4.7.2 Avaliação da capacidade do PAbs reconhecer a proteína nativa e da sua especificidade através de ELISA indireto e <i>Western blotting</i> ..	39
4.8 Separação imunomagnética (IMS)	40
4.8.1 Sensibilização das microesferas magnéticas	40
4.8.2 Limites de detecção da PCR associada à IMS em cultivos puros de <i>Salmonella</i> spp.	41
4.9 Análise estatística	42

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Seleção <i>in silico</i> de proteínas alvo para produção de anticorpos contra <i>Salmonella</i> spp.	44
5.2 Clonagem do fragmento da região codificadora do gene selecionado no vetor de expressão em <i>E. coli</i> pAE	53
5.3 Expressão e purificação da proteína recombinante InvH (rInvH)	57
5.4 Produção e titulação dos anticorpos policlonais (PAbs) anti- rInvH	59
5.5 Avaliação da capacidade do PAbs anti-rInvH reconhecer a proteína nativa e da sua especificidade através de ELISA indireto e <i>Western Blotting</i>	60
5.6 Sensibilização das microesferas magnéticas com o PAbs.....	65
5.7 Limites de detecção da PCR associada à IMS em cultivos puros de <i>Salmonella</i> spp.....	65
6 CONCLUSÕES	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios para a saúde pública no mundo todo atualmente é a prevenção, controle e a erradicação das doenças transmitidas por alimentos, sendo evidente o impacto social e econômico que a contaminação de alimentos por micro-organismos patogênicos pode ocasionar (KRÜGER et al., 2008). Nesse contexto, a contaminação de alimentos por *Salmonella* spp. merece destaque.

Bactérias do gênero *Salmonella* spp. são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae (FRANCO; LANDGRAF, 2005). De acordo com Shelobolina et al. (2004), o gênero *Salmonella* divide-se em três espécies: *enterica*, *bongori* e *subterranea*. *S. enterica* por sua vez, possui seis subespécies, sendo que a subespécie *enterica* apresenta a maioria dos mais de 2.400 sorovares já identificados, e é responsável por milhões de casos de infecções de origem alimentar em todo o mundo a cada ano, sendo os sorovares Typhimurium e Enteritidis os mais incriminados em surtos de origem alimentar (CENTERS for DISEASES CONTROL and PREVENTION, 2011; GRASSL; FINLAY, 2008; BRENNER et al., 2000; POPOFF; LE MINOR, 1997).

Em diversos países, *Salmonella* spp. é comumente o enteropatógeno mais incriminado a doenças transmitidas por alimentos (VARMA et al., 2005). Em 2008, nos Estados Unidos, foi a principal causa de internações e mortes em mais da metade dos surtos associados a alimentos no país (CDC, 2011).

No Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008) levantou dados sobre as doenças de origem alimentar no país por aproximadamente 10 anos, sendo as bactérias do gênero *Salmonella* spp. responsáveis por mais de 40% das doenças notificadas nesse período.

Água e alimentos contaminados são geralmente as principais fontes de transmissão de *Salmonella* spp. a humanos, sendo os produtos cárneos

frequentemente envolvidos em surtos. Carnes de frango e ovos têm sido veículos em inúmeros casos de infecções humana por *Salmonella* spp. (SHINOHARA et al., 2008).

Para a detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, a metodologia clássica de cultivo recomendada pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM, 1998) ainda é utilizada como metodologia padrão, e, baseia-se no isolamento destas bactérias em meios seletivos para posterior identificação bioquímica e sorológica.

Esta metodologia apresenta custo operacional elevado em função do tempo relativamente longo para ser completada (no mínimo 4 dias para obter-se um resultado negativo e até 7 dias para um positivo), além dos materiais e mão de obra envolvidos na execução das análises (BAM,1998). Desse modo, a necessidade de métodos mais rápidos e menos laboriosos de detecção tem levado ao desenvolvimento de pesquisas para a identificação rápida de *Salmonella* spp. em alimentos.

Atualmente, os kits para detecção rápida de *Salmonella* spp. em alimentos disponíveis comercialmente no Brasil são importados e apresentam altos custos de implantação e análises superiores ao custo da metodologia convencional de cultivo. Em virtude disso, novas metodologias para detecção têm sido amplamente desenvolvidas nas últimas décadas.

Os ensaios imunológicos, baseados na reação antígeno-anticorpo, apresentam maior facilidade de execução, rapidez na obtenção dos resultados, boa sensibilidade e especificidade quando comparados a metodologia tradicional de cultivo. Métodos como, por exemplo, o *Enzime-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (MANSFIELD; FORSYTHE, 2001; KLEINER, 2000) e a separação imunomagnética (IMS) (MOREIRA et al, 2009; MOREIRA et al., 2008; BRICHTA-HARHAY et al., 2008) tem-se mostrado interessantes quando na utilização para detecção de *Salmonella* em alimentos. A utilização da IMS associada a PCR aumenta a sensibilidade do teste, pois, ao concentrar e separar as células alvo dos demais inibidores da reação, bem como da

microbiota competitiva, permite que a sequência alvo seja detectada em concentrações mínimas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Selecionar, *in silico*, uma proteína de *Salmonella* spp. com as melhores características para ser utilizada como alvo na obtenção de anticorpos específicos para bactérias desse gênero e desenvolver uma metodologia que utiliza IMS associada à PCR para a detecção rápida deste patógeno em alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar e clonar gene que codifica antígeno específico de *Salmonella* spp. em plasmídeo de expressão em *Escherichia coli*.
- Produzir uma proteína recombinante e usá-la na imunização de camundongos.
- Produzir e caracterizar os anticorpos policlonais obtidos a partir dos camundongos previamente imunizados.
- Utilizar os anticorpos policlonais associados a microesferas magnéticas para produzir um reagente para uso em IMS.
- Padronizar e avaliar o desempenho da metodologia de detecção de salmonelas por IMS associada à PCR utilizando cultivo puro de *S. Typhimurium*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Salmonella* spp. e as Doenças Transmitidas por Alimentos

O gênero *Salmonella* faz parte do grupo de bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas. Morfologicamente, são bacilos não formadores de esporos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo, em sua maioria, móveis através de flagelos peritríqueos, exceto por *S. gallinarum* e *S. pullorum*. São mesófilas, com temperatura ótima de crescimento a 37°C e capazes de produzir ácido e gás a partir da glicose e de outros carboidratos, com exceção dos açúcares lactose e sacarose. São catalase positivas e oxidase negativas. Suportam uma ampla faixa de pH (entre 4,5 e 9,0) e são exigentes quanto a atividade de água (Aa) disponível, desenvolvendo-se em valores de Aa compreendidos entre 0,945 e 0,999 (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Embora a nomenclatura para classificação de *Salmonella* esteja em constante discussão, atualmente, o gênero *Salmonella* está dividido em três espécies: *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* e *Salmonella subterranea*. *S. enterica* por sua vez, está subdividida em seis subespécies, designadas por nomes ou números romanos: *S. enterica* subespécie *enterica* (*S. enterica* subespécie I); *S. enterica* subespécie *salamae* (*S. enterica* subespécie II); *S. enterica* subespécie *arizonae* (*S. enterica* subespécie IIIa); *S. enterica* subespécie *diarizonae* (*S. enterica* subespécie IIIb); *S. enterica* subespécie *houtenae* (*S. enterica* subespécie IV); e *S. enterica* subespécie *Indica* (*S. enterica* subespécie VI) (SHELOBOLINA et al., 2004).

Atualmente, há cerca de 2500 sorotipos (sorovares) conhecidos do gênero *Salmonella*, sendo que a maioria dos sorotipos envolvidos em doenças em humanos pertence a uma única subespécie, *S. enterica* subsp. *enterica*. Nesta espécie, os sorovares Typhimurium e Enteritidis estão entre os principais agentes causadores de doenças de origem alimentar em todo o mundo (CDC, 2011). Sorotipos das demais subespécies e de *S. bongori* são usualmente isolados de animais de sangue frio.

Os sorotipos das salmonelas além de serem ubíquos, podem estar estritamente adaptados a um hospedeiro particular. Os sorotipos de *S. enterica* subsp. *enterica* podem ser classificados de acordo com o seu hospedeiro. Uzzau et al. (2000) propõem que os sorotipos de *Salmonella* spp. podem ser divididos em: sorotipos restritos ao hospedeiro (sorotipos associados exclusivamente a um hospedeiro em particular, como *S. Typhi* e *Paratyphi A* a humanos); sorotipos adaptados ao hospedeiro (sorotipos que prevalecem em um hospedeiro em particular, mas que são aptos a causar doença em outras espécies, como *S. Choleraesuis*, a qual prevalece em suínos); e sorotipos que independem do hospedeiro (sorotipos capazes de causar gastroenterite autolimitante, e menos comumente a doença sistêmica em uma ampla gama de espécies hospedeiras, como *S. Typhimurium*). Os últimos são responsáveis por surtos de origem alimentar em humanos e por isso, são patógenos de relevante importância para a saúde pública (CDC, 2011).

Salmonella spp. é o enteropatógeno mais frequentemente associado a doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos, Reino Unido e em muitos outros países (VARMA et al., 2005), sendo que no ano de 2008, foi a principal causa de internações e mortes em mais da metade dos surtos associados a alimentos reportados nos Estados Unidos (CDC, 2011). A ingestão de água ou alimentos contaminados são as fontes principais de transmissão de *Salmonella* spp. a humanos, visto que, são capazes de multiplicar-se sem, no entanto, produzir alterações detectáveis no alimento.

Entre as fontes de contaminação com *Salmonella* spp., os produtos cárneos são predominantes. Carnes de frango e ovos têm sido veículos em inúmeros casos de infecções humanas causadas por *Salmonella* spp. (CDC, 2011), bem como o leite, vegetais e outros alimentos que podem sofrer contaminação cruzada após o processamento (SHINOHARA et al., 2008; FAVRIN et al. 2001). Carne suína também pode apresentar contaminação com *Salmonella* spp. logo após o abate, indicando que a contaminação pode ocorrer ainda durante o crescimento do rebanho ou na manipulação da carne no frigorífico (BESSA et al. 2004). Entre os sorotipos isolados em suínos, *S.*

Typhimurium foi o mais prevalente (BOTTELDOORN et al., 2003). Embora a prevalência de casos de gastroenterites esteja, em sua maioria, associada ao consumo de carne e ovos, *Salmonella* spp. é capaz de sobreviver em corpos d'água e assim, animais aquáticos são passíveis de contaminação, sendo encontrada em peixes e outros produtos marinhos, como camarões. Nestes casos, a contaminação pode ocorrer pela poluição das águas ou durante o processamento do pescado (KUMAR et al., 2003; BREMER; FLETCH; OSBORNE, 2003).

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos pode ocorrer pelo contato com superfícies contaminadas, quando a bactéria encontra nutrientes e condições adequadas, como pH, atividade de água e temperatura, podendo multiplicar-se rapidamente, e devido a manipulação incorreta, através da contaminação cruzada de outros alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Em um estudo que avaliou a presença de *Salmonella* spp. em 61 cortes de frango, 39,3 % das amostras foram positivas, sendo *S. Enteritidis* o sorovar mais prevalente (RIBEIRO et al. 2007). *S. Enteritidis* é o sorotipo com maior tropismo por órgãos reprodutivos de galinhas, sendo o principal responsável pela contaminação interna de ovos, o que acarreta um aumento na incidência da infecção por *S. Enteritidis* em frangos (OKAMURA et al. 2001). Embora o ambiente natural dos ovos não seja favorável ao desenvolvimento de *Salmonella* spp., devido ao pH natural da clara, a presença da lizosima e de anticorpos na gema, alguns sorotipos estão adaptados e conseguem sobreviver a essas condições adversas (GUARD-PETTER, 2001). A sobrevivência de *S. Enteritidis* na gema é maior do que no albúmen, especialmente quando os ovos são armazenados a temperatura ambiente por um longo período, pois os agentes bacteriostáticos presentes na clara podem não destruir as células de *S. Enteritidis* e essas podem migrar para a gema e manterem-se viáveis (BRAUN; FEHLHABER, 1995).

A infecção de galinhas poedeiras por *S. Enteritidis* e a consequente contaminação dos ovos é um fator relevante para o aumento de casos de salmonelose humana. Ovos e derivados contaminados com *Salmonella* spp.

têm sido incriminados na disseminação da bactéria e tem favorecido a contaminação cruzada no ambiente de preparo dos alimentos (TEO; OLIVEIRA, 2009). O sorovar Enteritidis também foi isolado em surtos de salmonelose locados no Rio Grande do Sul, no ano de 2005, demonstrando a relevante importância desse sorotipo nas contaminações por *Salmonella* spp. (MÜRMAN, 2008). Além de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, os sorovares Heidelberg, Newport, Infantis, Agona, Montevideo, e Saint Paul também são associados a surtos de toxinfecção alimentar (CHIU et al., 2005).

A contaminação de alimentos por micro-organismos patogênicos, sua prevalência, crescimento, multiplicação e/ou produção de toxinas são de interesse na Saúde Pública. Além disso, a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos (DTAs) é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, sendo responsável por reduções na produção mundial de alimentos, que afetam o crescimento econômico global (CDC, 2011). Nesse contexto, as salmoneloses tem sido foco de pesquisas e discussões que permitem o melhor entendimento da doença, bem como a garantia de produtos seguros no mercado.

A grande dificuldade em se obter dados sobre a doença deve-se à falta de notificações, visto que a maioria das gastroenterites é autolimitante, não necessitando de internação hospitalar. Forsythe (2002) revelou que somente 10% do total de surtos de origem alimentar no Brasil são notificados, devido às falhas no sistema de notificação e fiscalização. Ou seja, a importância das salmoneloses na incidência de surtos de origem alimentar ainda é subestimada no país.

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2008) revelou que, no período de 1999 a 2008, as bactérias do gênero *Salmonella* spp. foram responsáveis por 42,9% das enfermidades de origem alimentar, e que os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos foram ovos crus ou mal cozidos. O Rio Grande do Sul apresentou um dos maiores índices de notificação de surtos de salmonelose associada a alimentos, juntamente com o estado de São Paulo, demonstrando o grau de implantação da Vigilância

Epidemiológica nesses estados. Nadvorny et al. (2004) publicou que a salmonelose foi uma das doenças transmitidas por alimentos mais prevalentes no Rio Grande do Sul no ano de 2000.

A maioria dos sorotipos de salmonelas é patogênico ao homem, e os sintomas clínicos podem ser apresentados de três formas (FRANCO; LANDGRAF, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005): como febre tifóide, febre entérica e salmonelose.

Causada por *S. Typhi*, a febre tifóide acomete somente a humanos. A disseminação da bactéria é interpessoal, através da água e alimentos contaminados com material fecal humano. Os sintomas são muito graves e podem desencadear septicemia, febre alta, cefaléia, diarreia e vômitos, podendo evoluir a óbito. O período de incubação usualmente varia de sete a 21 dias e a duração da doença pode chegar a oito semanas. Após a infecção, os indivíduos podem se tornar portadores assintomáticos por meses ou anos, constituindo então uma fonte contínua de infecção.

Na febre entérica, o agente etiológico é a *S. Paratyphi* A, B e C, e os sintomas clínicos são mais brandos que na febre tifóide, podendo evoluir para septicemia e, freqüentemente, desenvolver um quadro de gastroenterite febril associado a vômito. O período de incubação é usualmente de 6 a 48 horas e a duração média da doença é de três semanas. Essa doença pode ser causada pelo consumo de água e alimentos contaminados, especialmente leite e vegetais crus, mariscos e ovos.

As salmoneloses são as infecções entéricas em decorrência de outras espécies de *Salmonella*, caracterizadas por um quadro de infecção gastrointestinal, com dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos fatais. Os sintomas aparecem de 12 a 36 horas, podendo durar até 72 horas. Trata-se da manifestação mais comum de infecção por *Salmonella* spp. e o episódio geralmente é autolimitante em dois a três dias, não necessitando de tratamento com antibióticos. Entretanto, é possível encontrar a bactéria nas fezes de adultos até oito semanas após o término da

infecção e por até 20 semanas em crianças menores de cinco anos, o que facilita a sua disseminação no ambiente (GOMEZ; CLEARY, 1998). As carnes, em geral, e ovos crus estão frequentemente associados à enfermidade, sendo que crianças, idosos e imunocomprometidos são naturalmente mais susceptíveis a infecções.

A dose infectante de *Salmonella* spp. para humanos saudáveis varia entre 10^6 e 10^8 UFC (HUMPHREY, 2004), embora tenham sido relatadas infecções com doses muito menores, isto porque a quantidade exata depende da cepa infectante, do tipo de alimento contaminado com a bactéria, bem como do estado fisiológico do hospedeiro. Em virtude disso, a Legislação Brasileira não estabelece limites permitidos para a presença da bactéria em alimentos e determina ausência da mesma em qualquer tipo de alimento (RDC nº 12, 2001).

As infecções alimentares causadas por salmonelas, anualmente, podem resultar em gastos de grande impacto econômico. Nos Estados Unidos, estima-se que houve gastos de 2,4 bilhões de dólares em custos médicos e perda de produtividade apenas em surtos de salmoneloses (USDA/ERS, 2003).

De modo a controlar e evitar surtos de salmonelose, medidas apropriadas no controle de qualidade e processamento devem ser aplicadas à indústria de alimentos. Atualmente, estas medidas são baseadas no sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), sendo necessários a identificação e isolamento do patógeno, bem como a fiscalização e intervenção dos órgãos de fiscalização quando da necessidade de retirada de um produto contaminado do mercado, por exemplo. Em virtude disso, métodos para detecção e monitoramento de micro-organismos patogênicos em alimentos, dentre eles *Salmonella* spp., necessitam de rapidez, praticidade, confiabilidade e custo acessível (CROCI et al., 2004).

3.2 Metodologia Convencional de Isolamento e Identificação de *Salmonella* spp.

A metodologia convencional para detecção de salmonelas em alimentos é onerosa e fastidiosa, em função da grande diversidade de materiais e mão de obra envolvidos na execução das análises. Além disso, o baixo número de células normalmente presentes, somado a microbiota competidora encontrada em alimentos contaminados, dificulta ainda mais a detecção de *Salmonella* spp. . A metodologia convencional de detecção é o método de cultivo clássico e aceito como padrão, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção da bactéria mesmo sob condições adversas (BAM, 1998).

Os métodos para identificação de *Salmonella* spp. em alimentos são compostos por três períodos de incubação (pré-enriquecimento em meio não-seletivo e enriquecimento e plaqueamento em meios seletivos), o que exige a utilização de diversos meios de cultura com características específicas, além de diversas vidrarias e equipamentos laboratoriais. Além disso, é composto da etapa de confirmação posterior através de testes bioquímicos e sorológicos, necessitando, no mínimo, de quatro dias para obter-se um resultado negativo e de até sete dias para se obter um resultado positivo (BAM, 1998).

A metodologia convencional, embora apresente limitações, ainda é considerada padrão para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos, devido à grande variedade de testes realizados, o que assegura a confiabilidade exigida na identificação da bactéria.

Dentre as limitações da metodologia convencional existe a competição da microbiota normalmente presente nos alimentos, que pode vir a diminuir a sensibilidade do teste, prejudicando o isolamento e identificação de *Salmonella* spp. nos meios seletivos, uma vez que essas bactérias, muitas vezes, apresentam características bioquímicas semelhantes às de *Salmonella* spp. . Além disso, algumas bactérias do gênero apresentam reações bioquímicas atípicas, o que pode vir a influenciar e/ou interferir nos resultados (FACH, et

al.,1999). E, somado a isso, o longo tempo necessário para detecção e confirmação dos resultados pela metodologia tradicional, gera a necessidade de métodos mais rápidos e menos laboriosos de detecção e leva a avanços significativos no desenvolvimento de tecnologias rápidas para identificação de patógenos em alimentos.

Dentre as novas metodologias pesquisadas, os ensaios imunológicos, baseados na reação antígeno-anticorpo, tem-se mostrado interessantes, quando na utilização para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos. Métodos como o ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, a técnica de *Western Blotting*, e a separação imunomagnética (IMS) apresentam maior facilidade de execução, rapidez na obtenção de resultados e boa sensibilidade e especificidade quando comparados à metodologia convencional de cultivo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

3.3 Separação Imunomagnética (IMS) associada a PCR

A separação imunomagnética (IMS) é uma técnica imunológica de separação e concentração de micro-organismos relativamente simples, e tem sido aplicada para aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de isolamento e detecção de diversos micro-organismos, bem como de bactérias patogênicas em alimentos. Este método utiliza microesferas de poliestireno magnetizadas cobertas com anticorpos policlonais ou monoclonais para, valendo-se de um magneto, realizar o isolamento e concentração do micro-organismo alvo em cultivos líquidos (OLSVIK et al., 1994). É considerada uma etapa relevante a ser utilizada antes da detecção de patógenos em alimentos, seja pela metodologia convencional, quanto pelas modernas técnicas moleculares de identificação de micro-organismos (BAEUMNER; NUGEN, 2008).

A IMS tem sido utilizada para detectar micro-organismos patogênicos em alimentos, tais como *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* (GASANOV et al., 2005; KACLIKOVA et al., 2001; UYTTENDAELE et al., 2000; FLUIT et al., 1993) *E. coli* O157 (CHAPMAN; ASHTON, 2003; REINDERS et al., 2002;

EVRENDILEK et al., 2001; YU; BRUNO, 1996), *Campylobacter jejuni* (YU et al., 2001) e *Salmonella* spp. (MOREIRA et al., 2009; MOREIRA et al., 2008; CONCEIÇÃO et al., 2008; JORDAN et al., 2004; MANSFIELD; FORSYTHE, 2001; FAVRIN et al., 2001; RIJPENS et al., 1999; TRKOV et al., 1999; CUDJOE et al., 1995).

No caso de *Salmonella* spp., a técnica tem sido usada para separá-las de outras enterobactérias no caldo de enriquecimento não-seletivo, em substituição a etapa de enriquecimento seletivo, antes de realizar a detecção por plaqueamento em ágar seletivo (TATAVARTHY et al., 2009; CONCEIÇÃO et al., 2008; MINE, 1997; MANSFIELD; FORSYTHE, 1996), associada a técnica de ELISA (MANSFIELD; FORSYTHE, 2001; KLEINER, 2000) ou PCR (MOREIRA et al., 2009; MOREIRA et al., 2008; BRICHTA-HARHAY et al., 2008; MERCANOGLU; GRIFFITHS, 2005; MERCANOGLU; AYTAC, 2002; HSIH; TSEN, 2001; CIVILINI et al., 2000; LI et al., 2000; RIJPENS et al., 1999). Uma das vantagens da técnica é justamente não necessitar da etapa de enriquecimento seletivo, pois os caldos de enriquecimento seletivo, em sua maioria, apresentam alta concentração de substâncias seletivas que podem ser letais para as células injuriadas. Além disso, a sensibilidade do teste diagnóstico é maior quando associado à IMS devido à possibilidade de captura de células lesadas; por concentrar o micro-organismo alvo, separando-o da microbiota competidora normalmente presente em alimentos contaminados (OLSVIK et al. 1994); e, quando associada à PCR, por separar as células alvo dos inibidores da reação (SPANOVA et al., 2003).

Atualmente, as pesquisas que envolvem a aplicação da IMS usualmente utilizam kits com microesferas magnéticas disponíveis comercialmente, os quais são importados e, em virtude disso, apresentam custos elevados, que dificultam a inserção dessa tecnologia na indústria de alimentos no país.

A IMS, assim como outros métodos imunológicos para detecção de patógenos em alimentos, utiliza anticorpos policlonais ou monoclonais ou ambos. Anticorpos são moléculas protéicas produzidas por linfócitos B que

reconhecem substâncias estranhas ao organismo, denominadas antígeno. A estrutura geral de um anticorpo consiste em molécula bifuncional, que compreende dois sítios de ligação ao antígeno (Fab) e um sítio efetor (Fc), no outro lado da molécula (ALZARI et al., 1988).

Anticorpos policlonais (PABs) são produzidos de forma muito simples e rápida a partir de um animal previamente imunizado com um antígeno (alvo) de interesse. Nesta técnica, diversos clones de linfócitos B são obtidos produzindo uma variedade de anticorpos específicos para os diferentes epítomos do mesmo antígeno, ou seja, anticorpos capazes de ligar-se de forma específica e com alta afinidade as mais diferentes frações do antígeno, conferindo uma maior sensibilidade quando aplicados em testes de imunodiagnóstico. Os protocolos de imunização são repetidos diversas vezes com baixas dosagens do antígeno, o que aumenta a afinidade do anticorpo, pois na presença limitada do antígeno, as células B de alta afinidade apresentam maior êxito de seleção e proliferação, em comparação a administração de altas doses do antígeno (HARLOW; LANE, 1988).

Após a imunização com o antígeno, geralmente administrado associado a substâncias que melhoram a resposta do sistema imune, o soro dos animais imunizados é coletado, purificado por cromatografia de afinidade ou por precipitação e armazenado. Embora, a metodologia para obtenção de anticorpos policlonais seja simples e rápida, a quantidade de soro produzido exige um grande número de animais imunizados, o que pode acarretar em diferenças na apresentação deste em cada animal. Essas desvantagens podem levar a uma diminuição na especificidade do teste, bem como resultar em reações inespecíficas com outras bactérias que podem apresentar epítomos semelhantes ao do antígeno alvo. De modo a evitar estes problemas, as amostras de soro dos animais devem ser monitoradas regularmente, selecionando aquelas que mantiverem as características desejadas (MOREIRA, 2005). Portanto, tanto a sensibilidade quanto a especificidade dos métodos imunológicos de detecção dependem do anticorpo utilizado, o que está diretamente relacionado ao antígeno escolhido como alvo.

Nesse contexto, a identificação de novos epítomos para a produção de anticorpos específicos e sensíveis têm se tornado um desafio atualmente. Assim, a utilização de ferramentas de bioinformática, através das quais pode-se armazenar, analisar e disponibilizar dados biológicos e moleculares, surge como uma alternativa para a obtenção de novos alvos (CHEN, 2011). Esses alvos devem, preferencialmente, ser proteínas de membrana externa, pois apresentam maior disponibilidade para a formação do complexo antígeno-anticorpo; devem estar presentes na maioria dos sorovares do gênero *Salmonella*, ou pelo menos nos mais comuns associados a surtos; devem ser expressas em grande quantidade; ser constitutivas; apresentar características antigênicas; e ser específicas para o gênero, evitando assim reações inespecíficas com outros patógenos que possam estar presentes no alimento.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica que baseia-se na replicação e amplificação *in vitro* de determinado fragmento de DNA. Dentre as diversas técnicas de biologia molecular que tem sido empregadas com sucesso na identificação de patógenos em alimentos, a PCR tem demonstrado ser uma alternativa rápida, acessível e sensível para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos (CHIU et al., 2005; MALORNY et al., 2003).

Durante a amplificação *in vitro* do DNA, realizada em termociclador, oligonucleotídeos sintéticos específicos, chamados *primers*, são capazes de reconhecer uma determinada sequência no DNA a ser estudada e, iniciar, com o auxílio da enzima DNA Polimerase e de outros componentes presentes na reação, a amplificação exponencial da sequência a partir de uma única cópia de DNA. O DNA amplificado pode então ser corado e analisado por eletroforese em gel, sob luz ultravioleta.

A sensibilidade e especificidade da técnica, as quais costumam ser elevadas, dependem de diversos fatores como, por exemplo: da multiplicação das células alvo e recuperação das células lesadas, através de enriquecimento antes da extração do DNA bacteriano, de modo a aumentar o número de microorganismos a um nível detectável e por consequência a concentração do DNA extraído; e das condições nas quais a reação é realizada, como a utilização da

concentração ideal dos reagentes e da temperatura de anelamento. A otimização dessas condições permite a amplificação somente da sequência alvo, diminuindo possíveis ligações inespecíficas dos *primers*, a formação de dímeros de *primers* e a ocorrência de resultados falso-positivos e/ou falso-negativos (MOREIRA, 2005).

Somado a isso, é indispensável para o sucesso da PCR, a correta escolha da sequência alvo e dos *primers* a serem utilizados na amplificação. Os alvos normalmente utilizados em testes associados a PCR para detecção de patógenos em alimentos são genes para produção de toxinas, enzimas específicas, fatores de virulência, plasmídeos ou genes rRNA. Entretanto, o gênero *Salmonella* não apresenta plasmídeo ou fator de virulência comprovadamente comum a todos os sorotipos (TRKOV; AVGUSTIN, 2003), e é intimamente relacionado aos gêneros *Escherichia*, *Shigella* e *Citrobacter* (McCLELLAND et al., 2001; COHEN; MECHANDA; LIN, 1996), patógenos frequentemente encontrados na microbiota competidora de um alimento contaminado.

Estudos demonstram que a utilização da IMS associada à técnica de PCR em tempo real pode ser eficiente na detecção rápida de *Salmonella* spp. em alimentos, sendo possível a identificação da bactéria em 3 h (LI et al., 2010), 8 h (HAGREN et al., 2008), ou 12 a 13 h (NOTZON et al., 2006; MERCANOGLU; GRIFFITHS, 2005). Entretanto, embora a sensibilidade da técnica seja maior e o tempo de detecção menor quando comparada a PCR tradicional, devido ao acompanhamento simultâneo da amplificação do DNA, o alto custo de implantação da tecnologia, que necessita de equipamentos e reagentes caros, bem como da capacitação dos profissionais para realização do teste, inviabiliza a mesma para utilização na rotina de laboratórios de análise.

Por outro lado, quando a técnica de IMS foi associada à PCR tradicional para a identificação de *Salmonella* spp. em alimentos, a detecção foi conseguida em até 3,5 h (LIEBANA et al., 2009), 24 h (EROL et al., 1999), 27 h (MOREIRA et al., 2009; MOREIRA et al., 2008) e 30 h (CIVILINI et al., 2000;

TRKOV et al., 1999), dependendo do tempo usado no enriquecimento ou sem a necessidade do mesmo.

Desse modo, a associação da IMS a PCR tradicional destaca-se por reduzir o tempo total de detecção, diminuindo o tempo de enriquecimento necessário para atingir o limite de detecção da PCR, devido à concentração das células alvo; por dispensar a utilização de enriquecimentos seletivos; e por eliminar possíveis inibidores da reação, através da separação das células alvo do restante da solução.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias, condições de cultivo e extração de DNA

Salmonelas e outras bactérias utilizadas neste trabalho para avaliar a capacidade dos anticorpos policlonais reconhecerem a proteína nativa e da sua especificidade e para avaliar a IMS associada a PCR (Tab. 1) foram obtidas das coleções de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil), do laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas (FAEM-UFPe) e do Laboratório de Imunologia Aplicada do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da UFPe (CDTec-UFPe). As cepas foram armazenadas a -20°C, em alíquotas de 100 µL na concentração final de 20% de glicerol, até o momento do uso. As cepas de *E. coli* comerciais utilizadas nos experimentos de clonagem e expressão da proteína recombinante foram adquiridas da empresa Invitrogen (USA).

Tabela 1. Bactérias utilizadas nos experimentos para avaliar a capacidade dos anticorpos policlonais reconhecerem a proteína nativa e da sua especificidade e para avaliar a IMS associada a PCR.

Bactérias	Sorovares	Sorogrupos
<i>Salmonella enterica</i>	Typhimurium	B
	Derby	B
	Rissens	C1
	Hadar	C2
	Infantis	C2
	Enteritidis	D1
	Illinois	E1
	Muenster	E1
	Give	E1
	Adelaide	O
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
<i>E.coli</i>	-	-
<i>Proteus sp.</i>	-	-

Para os experimentos, duas a três colônias isoladas de cada uma das cepas da Tabela 1 foram cultivadas em 5 mL de caldo Luria Bertani (LB, 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl) a 37°C por 16 h sob agitação constante (150 rpm). Posteriormente, os cultivos foram centrifugados, sendo o *pellet* lavado por três vezes entre as centrifugações, em solução salina fosfatada tamponada estéril (PBS, pH 7,4). A densidade celular dos cultivos foi ajustada para 1,0 a 600 nm (densidade óptica a 600nm, DO₆₀₀). As cepas de clonagem e expressão foram cultivadas em caldo LB contendo os antibióticos ampicilina (100 µg.mL⁻¹) e/ou cloranfenicol (50 µg.mL⁻¹), de acordo com a cepa avaliada, sob agitação de 200 rpm, a 37°C por 16 h.

A extração de DNA genômico a partir de 1 mL dos cultivos puros das bactérias foi realizada conforme as instruções do kit Illustra™ bacteria genomic Prep Mini Spin (G.E Healthcare) visando a amplificação do gene escolhido para a clonagem no vetor de expressão em *E. coli* (pAE). E, para a extração do DNA bacteriano utilizado na determinação do limite de detecção da IMS associada a PCR a partir dos cultivos puros de *S. Typhimurium*, 20 µL de solução de lise 1:1 (0,125% SDS e 0,05M NaOH) foram adicionados às microesferas após a IMS, a solução foi aquecida a 95°C por 15 min e centrifugada a 15.000 rpm por 5 min. As amostras de DNA extraído foram armazenadas a -20°C até o momento do uso e avaliadas quanto a sua pureza através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.2 Seleção *in silico* de proteínas alvos para produção de anticorpos contra *Salmonella* spp.

Para a escolha de um novo alvo para a produção de anticorpos contra *Salmonella*, inicialmente foram analisados os genomas dos sorovares *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis e de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, utilizado o programa PSORTdb (YU et al., 2011), buscando identificar proteínas de membrana externa (*outer membrane proteins* - OMP).

Todas as sequências de prováveis proteínas de interesse selecionadas pelo PSORTdb foram comparadas com as sequências de salmonelas e de outros micro-organismos depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do alinhamento de sequências utilizando o programa *Basic Local Alignment Search Tool for proteins* (BLASTp, 2011) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, utilizando a configuração padrão do programa (matriz BLOSUM62).

A análise das proteínas pré-selecionadas foi realizada a partir de uma revisão bibliográfica e programas de bioinformática, visando à seleção daquelas com as melhores características para serem utilizadas como alvo.

A identificação de famílias de proteínas e domínios protéicos foi realizada com o auxílio das ferramentas Pfam (FINN et al., 2010) e PROSITE (SIGRIST et al., 2010), através de múltiplos alinhamentos de sequências e similaridade. O programa DOLOP (MADAN et al., 2006), foi utilizado visando identificar lipoproteínas bacterianas, e, os alvos pré-selecionados também foram submetidos ao programa TMHMM (CBS, 2010) <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, uma ferramenta de predição de hélices transmembrana em proteínas.

Para a obtenção de uma maior confiabilidade na seleção do alvo de interesse, a proteína selecionada teve sua sequência alinhada pelos programas EMBOSS Needle (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/), ferramenta que faz o alinhamento global entre duas sequências de estudo e Clustal Omega (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo), para alinhamento múltiplo das sequências de interesse, ambos programas, foram utilizados com suas configurações padrões, e, também foi submetida às ferramentas Emini (EMINI, et al., 1985), para predição da acessibilidade de superfície da proteína e Bepipred (LARSEN; NIELSEN, 2006), algoritmo que prediz a localização de epítomos lineares de células B em proteínas.

4.3 Clonagem do fragmento da região codificadora do gene selecionado no vetor de expressão em *E. coli* pAE

4.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores e amplificação por PCR do fragmento da região codificadora do gene selecionado

Para a amplificação do fragmento da região codificadora do gene selecionado, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), com a utilização do programa VectorNTI 9.0 (Invitrogen, 2003), a partir da sequência gênica da proteína escolhida, depositada no GenBank. Visando a clonagem direcional do gene no plasmídeo pAE (RAMOS et al., 2004), foi desenhado um *primer forward*, contendo um sítio de restrição para a enzima *Bam*HI, e um *primer reverse*, contendo um sítio de restrição para a enzima *Eco*RI, sendo os *primers* sintetizados pela Eurofins MWG Operon (Huntsville- AL, USA).

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12,5 μ L, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde, 5 pmol. μ L⁻¹ de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*) e mix comercial para PCR Master Mix (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Reações com e sem DNA purificado de *Salmonella* Typhimurium foram utilizadas como controle positivo e negativo da PCR, respectivamente. A temperatura ideal de anelamento dos *primers* foi determinada visando à obtenção de um produto da PCR correspondente ao gene. A amplificação do fragmento de DNA ocorreu em termociclador BioCycler (BioSystems - modelo MJ906G) e consistiu de uma etapa de desnaturação inicial (94°C, 5 min) seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (60 °C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min). Ao término destes 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (72°C, 5 min). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% e purificados com kit GFX™ PCR and gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.3.2 Clonagem do gene selecionado no vetor pAE

Os protocolos de clonagem foram realizados de acordo com metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001), com modificações. O fragmento da região codificadora do gene selecionado, amplificado por PCR, foi purificado utilizando-se o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA Gel Band Purification (G.E Healthcare). Do mesmo modo, o vetor de expressão em *E. coli* (pAE) foi extraído e purificado com kit GFX™ Micro Plasmid Prep (GE Healthcare), de acordo com as especificações do fabricante.

O produto purificado da PCR e o vetor pAE foram digeridos por 1 h a 37°C com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI (New England - BioLabs) para a reação de ligação mediada pela enzima T4 DNA - Ligase (Invitrogen) por 1 h a 16°C. Um microlitro do produto da ligação foi utilizado para transformar, por choque térmico, a cepa de *E. coli* BL21(DE3) TOP10 e o volume da transformação foi plaqueado em ágar LB (caldo LB contendo 2% de agar) suplementado com ampicilina (100 µg.mL⁻¹) e incubado a 37°C, por aproximadamente 18 h.

Os possíveis clones recombinantes foram selecionados pela técnica de triagem rápida “microprep” (JOUGLARD et al., 2002). As colônias suspeitas de serem recombinantes foram cultivadas em 5 mL de caldo LB suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina para a extração e purificação dos DNAs plasmidiais através da utilização do kit GFX™ Micro Plasmid Prep (GE Healthcare).

Para avaliar o sucesso da clonagem, o vetor construído foi digerido com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na construção, e, os produtos da digestão (vetor e inserto) foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 0,8%. Além disso, o plasmídeo recombinante foi utilizado como DNA molde em uma PCR e sequenciado em sequenciador MegaBACE 1000 (Amershan Biosciences, GE Healthcare). Os dados provenientes do sequenciamento foram agrupados e analisados no programa ContigExpress

(Invitrogen), e as *contigs* foram alinhadas no programa BLAST (NCBI) com outras seqüências previamente depositadas no GenBank.

4.4 Expressão da proteína recombinante

Após a confirmação dos possíveis clones recombinantes por PCR, sequenciamento e análise de restrição, o plasmídeo pAE contendo o gene escolhido purificado foi utilizado para transformar, por choque térmico, as cepas de expressão *E. coli* BL21(DE3) pLysS e Star, visando avaliar a expressão em pequena escala da proteína recombinante.

O produto da transformação foi cultivado em 5 mL de caldo LB contendo ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e/ou cloranfenicol ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), de acordo com a cepa avaliada, sob agitação de 200 rpm, a 37°C por 16 h. Após esse período, 1 mL do pré-inóculo foi transferido para tubos contendo 9 mL de caldo LB acrescido dos antibióticos correspondentes para cada cepa nas concentrações adequadas, sendo os tubos, novamente submetidos as mesmas condições de temperatura e agitação. Quando a densidade óptica dos cultivos atingiu aproximadamente 0,6 a 600 nm, uma alíquota da amostra foi retirada para posterior utilização como controle anterior a indução. O restante do cultivo foi então induzido à expressão da proteína recombinante por 3 h sob agitação de 200 rpm e temperatura de 37°C , mediada pela adição de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,5 mM. Após as 3 h de indução, alíquotas de 1 mL dos cultivos foram coletadas e centrifugadas por 1 min a 13000 rpm. O *pellet* celular foi ressuspenso em tampão de amostra contendo 2 β -mercaptoetanol, fervido a 100°C por 10 min e, então, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15%.

A expressão em pequena escala da proteína recombinante também foi confirmada por *Western blotting*, conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). As proteínas foram submetidas à SDS-PAGE 15% e eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare) por 1 h, com a fonte ajustada para diferença de potencial elétrico (DDP) 100 V. A membrana foi bloqueada em solução de PBS com 0,05% de Tween 20 (PBS-T)

contendo 5% de leite em pó desnatado e incubada *overnight* a 4 °C. Posteriormente, a membrana foi incubada por 1 h a temperatura ambiente em PBS-T contendo anticorpo monoclonal de camundongo anti-cauda de histidina (Anti-His, Sigma) (1:5000) e depois, novamente incubada em PBS-T contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulina (Ig) de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) (1:4000). A membrana foi submetida a três lavagens com PBS-T após cada uma das incubações. Finalmente, a reação na membrana foi revelada em solução cromógena de tetrahydrocloroto de diaminobenzedina (DAB).

Após a constatação da expressão da proteína pelas técnicas de SDS-PAGE e *Western Blotting*, iniciou-se a produção da proteína em larga escala (500 mL). Uma nova transformação foi realizada por choque térmico na cepa de *E.coli* Star. Um cultivo em 25 mL de caldo LB com ampicilina na concentração relatada foi realizado por 16 h a 37°C. Posteriormente, o cultivo foi transferido para um volume de 500 mL de caldo LB com o antibiótico indicado na concentração adequada e a indução, novamente realizada no momento em que foi atingida a D.O de aproximadamente 0,6 em 600 nm, sob as mesmas condições.

4.5 Purificação da proteína recombinante

A purificação da proteína recombinante foi realizada através de cromatografia de afinidade em coluna Hi-Trap (GE Healthcare) carregada com níquel (Ni⁺²-Sephrose, Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Após a indução da expressão da proteína em larga escala, o cultivo de 500 mL foi centrifugado a 10.000 rpm, por 10 min a 4°C e o *pellet* ressuspenso em tampão de lavagem (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl e 0,068% de Imidazole), submetido à sonicação por sete ciclos de 20 segundos a 60 Hz e centrifugado novamente. O sobrenadante foi armazenado e o *pellet* lavado três vezes em PBS. Suspendeu-se o *pellet* lavado em tampão de lavagem com N-LauroylSarcosine (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl, 0,068% de Imidazole e 0,2% de N-LauroylSarcosine) e deixou-se armazenado a 4°C sob agitação

constante por 48 h. Posteriormente, o material foi novamente centrifugado, sendo o sobrenadante armazenado e o *pellet* ressuspense em tampão de lavagem com uréia (0,234% de NaH₂PO₄, 2,92% de NaCl, 0,068% de Imidazole e 0,36% de Uréia), na qual permaneceu por mais dois dias sob agitação a 4°C. O material foi centrifugado e o sobrenadante armazenado, obtendo-se, ao final do processo, três sobrenadantes (tampão de lavagem, tampão de lavagem com N-LauroylSarcosine e tampão de lavagem com uréia), os quais foram visualizados por SDS-PAGE 15% para verificar e confirmar em qual fração se encontrava a proteína recombinante.

O sobrenadante no qual foi obtida a proteína foi submetido à diálise rápida contra tampão PBS, pH 7,4 (1000x o volume) por aproximadamente 16 h a 4°C. A proteína dialisada foi filtrada em filtro 0,45 µm (Millipore) e submetida à purificação por cromatografia de afinidade para utilização nos testes de ELISA. As eluições da proteína purificada foram coletadas em alíquotas de 1 mL e posteriormente concentradas em solução de polietilenoglicol a 20% (PEG 20.000), quantificadas pelo Kit BCATM Protein Assay (Pierce) e o grau de sua pureza visualizado através de SDS-PAGE 15%.

4.6 Produção de anticorpos policlonais (PAbs)

Para a produção dos PAbs, três camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 8 semanas de vida foram imunizados 8 vezes, intraperitonealmente (i.p.), com 40 µg da proteína recombinante dialisada, utilizando-se adjuvante de Freund completo (AFC, v/v) na primeira dose, e incompleto (AFI, v/v) nas doses subsequentes. As imunizações ocorreram a intervalos de uma semana entre elas, exceto entre a primeira e a segunda imunizações, onde o intervalo foi de duas semanas. Semanalmente, coletou-se sangue dos camundongos por punção do plexo retro-ocular, sendo o soro obtido após aquecimento da amostra coletada por 15 min a 37°C e centrifugação a 5000 rpm por 7 min. O soro coletado foi armazenado a - 20°C.

As amostras de soro foram filtradas em filtro de 0,45 μm e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A HiTrap Proteína A HP (GE, Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. As alíquotas purificadas coletadas em Tris-HCl (pH 9,0) foram dialisadas por 18 h contra PBS (500 x o volume) a 4°C. Após a diálise, a concentração dos anticorpos ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi determinada por espectrofotometria a 280 nm. O cálculo foi realizado através do coeficiente de extinção molar da IgG (1,35). Os anticorpos purificados foram armazenados a - 20°C até o momento do uso.

4.7 Caracterização dos PAbs

4.7.1 Titulação dos PAbs

Os PAbs foram titulados através de ELISA indireto contra a proteína recombinante purificada em coluna de afinidade. Para o ELISA indireto, 100 ng da proteína recombinante diluída em 100 μL de tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) foram adicionadas a cada cavidade de placas de poliestireno de 96 cavidades (Polysorp, Nunc). As placas foram incubadas a 37° C por 1 h e posteriormente lavadas 3 vezes com 200 μL de PBS-T por cavidade. Os PAbs diluídos em base dois (de 1: 500 a 1: 1024000) foram adicionados às cavidades da placa em triplicata (100 μL /cavidade) e incubados por 1 h a 37°C. Após lavar as placas por 3 vezes com PBS-T, anticorpo de cabra anti-Ig de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:4000 em PBS-T foi adicionado e a placa foi novamente incubada como exposto. Após, a placa foi lavada 5 vezes com PBS-T, para a retirada do excesso de conjugado, e foi adicionado 100 μL /cavidade da solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD) diluída em tampão fosfato-citrato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H_2O_2). A placa foi mantida por 15 min no escuro a temperatura ambiente e a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro para microplacas (Thermo Plate) com filtro de 450 nm. Como controle negativo foi utilizado soro pré-imune e como controle da reação foi utilizado a proteína rInIA (MENDONÇA, 2008) e o respectivo soro policlonal (anti-rInIA). O título de anticorpos foi expresso como

a recíproca da última diluição que apresentou DO_{450} média maior ou igual a obtida pelos controles negativos.

4.7.2 Avaliação da capacidade do PAb reconhecer a proteína nativa e da sua especificidade através de ELISA indireto e *Western blotting*

Para o ELISA indireto, as bactérias testadas (Tab. 1) foram cultivadas sob agitação em 5 mL de caldo LB por 12 h a 37°C. Após centrifugação e lavagem em PBS estéril por 3 vezes, as células foram ressuspensas em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e tiveram suas concentrações ajustadas para $DO_{600} = 1,0$. Para avaliar a capacidade do PAb reconhecer a proteína nativa e a sua especificidade, cavidades de placas de ELISA foram sensibilizadas com 100 μ L das suspensões contendo células íntegras, submetidas à fervura a 100°C por 10 min e a aquecimento de 60°C por 10 min. As placas foram incubadas por 18 h a 4°C e, posteriormente, lavadas 3 vezes com 200 μ L de PBS-T por cavidade.

O PAb (concentração inicial de 3,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi diluído 1:1000 e adicionado às cavidades e as placas foram incubadas por 1 h a 37°C. Após 3 novas séries de lavagens, o anticorpo de cabra anti-Ig de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:4000 foi adicionado e incubado por mais 1 h a 37°C. O excesso de conjugado foi retirado após 5 lavagens com PBS-T e a solução cromógena OPD foi adicionada. O soro de camundongo pré-imune também foi confrontado com as células íntegras das bactérias. As reações entre a proteína recombinante obtida e o PAb, entre a mesma proteína e o soro do camundongo pré-imune e entre a proteína rInIA e o soro policlonal anti-rInIA foram utilizadas como controles positivo, negativo e da reação, respectivamente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm após 15 min de reação no escuro. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Para o *Western blotting*, as bactérias testadas foram cultivadas sob agitação em 5 mL de caldo LB por 12 h a 37°C, e após centrifugação e

lavagem em PBS estéril por 3 vezes, as células foram ressuspensas em PBS estéril e, em seguida tiveram suas concentrações ajustadas para $DO_{600}=1,0$.

Um volume de 1 mL da suspensão foi centrifugado por 2 min a 13.000 rpm. Os *pellets* foram ressuspensos em 80 μ L de água Milli-Q estéril, adicionados de 20 μ L de tampão de amostra 5X, e, posteriormente, fervidos a 100°C por 10 min. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE a 15% e, em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas sob refrigeração para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) por 1 h, com a fonte ajustada para diferença de potencial elétrico (DDP) 100 V. As membranas foram bloqueadas por 18 h com 5% de leite em pó desnatado em PBS-T. O PAb obtido foi diluído 1:1000 em PBS-T, adicionado à membrana e incubado a temperatura ambiente por 1 h. Após a lavagem com PBS-T, foi adicionado o anticorpo de cabra anti-Ig de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:4000 e a membrana incubada novamente sob as mesmas condições por mais 1 h. Por fim, a membrana foi submetida a três lavagens durante 15 min cada com PBS-T para a aplicação da solução de revelação. A revelação foi realizada por quimiluminescência utilizando-se o kit ECL *Western Blotting* Substrate (PIERCE), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação entre a proteína recombinante e o PAb obtido foi utilizada como controle positivo.

4.8 Separação Imunomagnética (IMS)

4.8.1 Sensibilização das microesferas magnéticas

As microesferas magnéticas utilizadas neste experimento são de poliestireno, cobertas com proteína A, possuem 0,86 μ m de diâmetro e apresentam-se em suspensão com 1% de sólidos (Bangs Laboratories). As microesferas com proteína A foram sensibilizadas com o PAb obtido de acordo com as recomendações de Conceição (2004). Primeiramente, as microesferas foram ressuspensas em uma concentração de 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, lavadas 3 vezes em tampão borato de sódio (50 mM, pH 8,2), e recuperadas através de um concentrador de microesferas magnético (MPC-S, Dynal, Oslo, Norway). Após

as lavagens, o PAb foi adicionado às microesferas em um volume de tampão borato de 500 µL contendo 0,6 mg.mL⁻¹ dos anticorpos. As microesferas foram incubadas para sensibilização por 18 h a 4° C, sob agitação constante. Posteriormente a incubação, as microesferas sensibilizadas foram recuperadas com o concentrador magnético e o sobrenadante contendo os anticorpos não ligados foi reservado para determinação da concentração. As microesferas foram lavadas três vezes em tampão borato, ressuspensas a 1% de sólidos em tampão de estoque (tampão borato de sódio 10 mM, ph 8,5, + 0,01 BSA + 0,05% Tween 20 + 10 mM EDTA + 0,1% NaN₃) e armazenadas a 4° C. A quantidade de anticorpos adsorvidos às microesferas foi indiretamente determinada a partir da diferença entre a concentração inicial adicionada na sensibilização e a concentração de PAbs não-ligados às microesferas, obtidas através da leitura da absorbância do sobrenadante em espectrofotômetro a 280 nm.

4.8.2 Limite de detecção da PCR associada à IMS em cultivos puros de *Salmonella* Typhimurium

Células de *S. Typhimurium* foram cultivadas em caldo LB por 12 h, sob agitação de 200 rpm a 37° C, para determinar o limite de detecção da PCR associada à IMS, ou seja, determinar o número mínimo de células de salmonelas o qual a IMS é capaz de recuperar a partir de um cultivo puro de *Salmonella*. Para isso, a concentração do cultivo foi ajustada para DO₆₀₀= 1,0, e, posteriormente, o cultivo foi diluído em série decimal em PBS estéril, de modo a serem obtidas concentrações de *S. Typhimurium* de 10⁰ a 10⁹ UFC.mL⁻¹. Dez microlitros das microesferas sensibilizadas com os PAbs foram adicionados a duas alíquotas de 1 mL de cada diluição. As alíquotas foram incubadas à temperatura ambiente por 45 min sob agitação constante. As salmonelas capturadas pelas microesferas foram concentradas durante 3 min com o concentrador magnético. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e as microesferas foram lavadas 3 vezes em PBS-T e uma vez em PBS estéril. Para determinação do limite de detecção da IMS associada à plaqueamento

em ágar seletivo, as microesferas de uma alíquota foram ressuspensas em 20 μL de PBS estéril, semeadas em placas contendo ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e as placas incubadas *overnight* a 37°C para observação do crescimento de colônias típicas. As microesferas da segunda alíquota foram ressuspensas em 20 μL de solução de lise 1:1 (0,125% SDS e 0,05M NaOH) e fervidas por 15 min para a extração do DNA a ser utilizado na PCR.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12,5 μL , contendo 1 μL de DNA extraído pela solução de lise, 5 $\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de cada um dos *primers* para o gene *invH* (*forward* e *reverse*) e mix comercial para PCR Master Mix (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Reações com e sem DNA purificado de *S. Typhimurium* foram utilizadas como controle positivo e negativo da PCR, respectivamente. A amplificação dos DNAs consistiu de uma etapa de desnaturação inicial (94°C, 5 min) seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (60°C, 1 min) e extensão (72°C, 1 min). Ao término destes 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (72°C, 5 min) em termociclador BioCycler (BioSystems - modelo MJ906G). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8%

4.9 Análise estatística

Para avaliar se as diferenças obtidas no ensaio de ELISA indireto, eram significativas, foi utilizado o Teste de Tukey, com o auxílio do programa Statistix 9, onde o valor de P menor que 0,05 foi considerado significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contaminação de alimentos por bactérias do gênero *Salmonella* spp. é uma preocupação para a indústria de alimentos no mundo todo. O número considerável de surtos associados aos mais diversos sorovares do gênero (CDC, 2011), evidencia a necessidade do desenvolvimento de métodos rápidos, padronizados, acessíveis e reprodutíveis para detectar esse micro-organismo.

No Brasil, a legislação vigente preconiza a ausência de *Salmonella* spp. em qualquer tipo de alimento, o que demonstra a importância desse patógeno, tanto para a indústria quanto para a agência reguladora no país (RDC nº 12, 2001). Em vista disso, o foco principal deste trabalho foi desenvolver um método rápido para detecção de *Salmonella* spp. em alimentos utilizando a separação imunomagnética associada a PCR (IMS-PCR).

Inicialmente, análises *in silico* permitiram definir um antígeno-alvo para a produção e caracterização de anticorpos policlonais, os quais foram aplicados no teste diagnóstico de *Salmonella* spp. Para a obtenção desses anticorpos, algumas características devem ser observadas durante a escolha e definição de um antígeno-alvo. Ele deve ser, preferencialmente, um antígeno exposto, como, por exemplo, proteínas de membrana externa, o que facilita seu acesso e reconhecimento pelo anticorpo. É importante que essa proteína não seja secretada pela bactéria, e sim permaneça ancorada à superfície bacteriana. Também é desejável que a proteína esteja presente nos principais sorovares de *Salmonella* spp. e que seja expressa de modo constitutivo, favorecendo sua detecção mesmo sob condições adversas.

Outro aspecto importante a ser considerado, é que o alvo escolhido deve apresentar baixa identidade com proteínas de outros micro-organismos, em vista da grande diversidade de patógenos contaminantes em um alimento, pois, gêneros como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella* e *Citrobacter*, por exemplo, possuem micro-organismos comumente encontrados em alimentos

contaminados, e, por serem bactérias com alto grau de parentesco intimamente associadas à *Salmonella* spp., seu genoma e, conseqüentemente, suas proteínas são bastante similares (McCLELLAND et al., 2001; COHEN; MECHANDA; LIN, 1996). Esse fato dificulta ainda mais a seleção de proteínas-alvo capazes de distinguir o gênero *Salmonella* dos demais contaminantes.

5.1 Seleção *in silico* de proteínas alvo para produção de anticorpos contra *Salmonella*

As ferramentas de bioinformática atualmente são indispensáveis para atender a constante expansão dos dados biológicos advindos da Biologia Molecular. Essa manipulação de dados abrange áreas da Biologia, Matemática, Computação e Estatística, que, em conjunto, conseguem obter, armazenar, analisar, interpretar e compartilhar as mais diversas informações biológicas. Desse modo, as ferramentas de bioinformática são capazes, por exemplo, de criar bancos de dados, comparar sequências, predizer estruturas e funções, facilitando o acesso e a confiabilidade na obtenção de dados biológicos (BOREM; SANTOS, 2001).

A análise *in silico* dos genomas de *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis str. P125109 (nº de acesso NC_011294.1) e de *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium str. LT2 (NC_003197.1), sorovares estes, mais associados em surtos causados por *Salmonella* spp., através do programa PSORTdb (YU et al., 2011), uma ferramenta de predição da localização subcelular de proteínas bacterianas, resultou na identificação de 190 prováveis OMPs.

Posteriormente, essas proteínas foram alinhadas pelo programa BLASTp, um algoritmo que compara a sequência da proteína estudada com todas as sequências genômicas depositadas no banco de dados do NCBI. Através do BLAST é possível identificar, no banco de dados, a presença de sequências similares à pesquisada.

Após o alinhamento das 190 OMPs obtidas pelo programa BLASTp, apenas três proteínas demonstraram potencial para serem utilizadas como alvo. Essas três apresentaram alta identidade com a maioria dos sorovares de *Salmonella* ou com os mais envolvidos em surtos, e baixa similaridade com as sequências dos enteropatógenos comumente encontrados em alimentos contaminados, em especial, com cepas de *E. coli*, as quais podem gerar reações inespecíficas e/ou resultados errôneos em testes de alta sensibilidade como os de imunodiagnóstico. São elas as proteínas *Host colonization factor* (ShdA), *Cell adherence-invasion protein* (InvH) e *AIDA transporter-like protein* (AIDA). Os resultados do alinhamento local pelo programa BLASTp estão resumidamente apresentados na Tabela 2. As proteínas de *Salmonella* citadas tiveram similaridade e identidade relevantes em relação à primeira (*E. coli* 1, nº de acesso ZP_08355347.1) e a última sequência protéica de *E. coli* (*E. coli* 2, ZP_06658974.1) apontadas no alinhamento, mas inferiores às das outras proteínas avaliadas.

Tabela 2. Resultados parciais do alinhamento, no programa BLASTp, das proteínas pré selecionadas *Host colonization factor* (ShdA), *AIDA transporter-like protein* (AIDA) e *Cell adherence-invasion protein* (InvH) com a primeira e última sequências protéicas de *E. coli* identificadas no alinhamento.

Proteína de <i>Salmonella</i>	Proteína de <i>E. coli</i> 1 ^a		Proteína de <i>E. coli</i> 2 ^b	
	QC ^c	ID ^d	QC ^c	ID ^d
SdhA	65%	57%	60%	59%
InvH	34%	46%	41%	31%
AINDA	78%	48%	28%	35%

^a Primeira proteína de *E. coli* identificada no alinhamento (ZP_08355347.1)

^b Última proteína de *E. coli* identificada no alinhamento (ZP_06658974.1)

^c Cobertura de sequência (*Query coverage*)

^d Identidade

As três proteínas foram submetidas ao DOLOP (MADAN et al., 2006), programa que identifica lipoproteínas bacterianas. Inúmeras funções tanto estruturais quanto funcionais são atribuídas a essas proteínas, como por exemplo, funções relacionadas à virulência, o que sugere que as lipoproteínas são potencialmente antigênicas e interessantes para serem utilizadas como alvo (HARTWIG, 2006). Ainda, esses alvos foram submetidos ao programa TMHMM (CBS, 2010), uma ferramenta de predição de hélices transmembrana em proteínas, pois a presença dessas frações expostas na proteína favorece a interação antígeno-anticorpo. Por fim, foram utilizados os programas Pfam (FINN et al., 2010) e PROSITE (SIGRIST et al., 2010), que identificam famílias de proteínas e domínios protéicos.

A proteína ShdA (nº de acesso 207857923) é uma proteína pertencente a família das autotransportadoras, universalmente distribuída entre a subespécie I de *Salmonella* e que possui capacidade imunogênica (KINGSLEY et al., 2002; KINGSLEY, et al., 2004). Os resultados da análise *in silico* revelaram que ShdA não é considerada uma lipoproteína e não apresenta nenhuma região transmembrana identificada (FINN et al., 2010; CBS, 2010; SIGRIST et al., 2010; MADAN et al., 2006). A proteína AIDA (nº de acesso 16765833), da mesma forma que a ShdA, também é uma proteína transportadora que não é considerada uma lipoproteína e não apresenta região transmembrana (FINN et al., 2010; CBS, 2010; SIGRIST et al., 2010; MADAN et al., 2006).

Por sua vez, a proteína InvH (nº de acesso 207858162) apresentou, dentre os três possíveis alvos encontrados, os indicadores de similaridade mais baixos quando comparada com as proteínas de *E. coli* no alinhamento do BLASTp. Além disso, InvH é uma lipoproteína de membrana externa envolvida nos mecanismos de secreção tipo III (FINN et al., 2010; SIGRIST et al., 2010; MADAN et al., 2006; DAEFLER; RUSSEL, 1998; CRAGO; KORONAKIS, 1998) e apresenta uma pequena região transmembrana (CBS, 2010).

Os alvos pré-selecionados também foram submetidos ao programa EMBOSS Needle, para a obtenção de dados que corroborassem com a seleção da proteína de interesse. A ferramenta EMBOSS Needle alinha duas sequências de estudo, fazendo a anotação da sequência global entre elas, incluindo os *gaps* ao longo de toda a sua extensão. As proteínas ShdA, AIDA e InvH de *Salmonella* foram comparadas, novamente, com a primeira e a última sequência protéica de *E. coli* apontadas no alinhamento pelo BLASTp. Nesse alinhamento, a proteína InvH apresentou, novamente, as indicações de similaridade mais atrativas entre as três proteínas estudadas. Como mostrado na Fig. 1, os valores de identidade entre a InvH de *Salmonella* e as de *E. coli* 1 e 2 são os menores (23,5% e 15,1%, respectivamente), quando comparados com os mesmos valores da proteína ShdA (36,5% e 24,4%, respectivamente) e AIDA (36,5% e 19,5%, respectivamente).

ShdA_S x ShdA_E1	ShdA_S x ShdA_E2
# Length: 2115	# Length: 2041
# Identity: 772/2115 (36.5%)	# Identity: 497/2041 (24.4%)
# Similarity: 970/2115 (45.9%)	# Similarity: 605/2041 (29.6%)
# Gaps: 698/2115 (33.0%)	# Gaps: 1178/2041 (57.7%)
# Score: 2983.0	# Score: 2056.5
AIDA_S x AIDA_E1	AIDA_S x AIDA_E2
# Length: 2105	# Length: 2141
# Identity: 768/2105 (36.5%)	# Identity: 418/2141 (19.5%)
# Similarity: 969/2105 (46.0%)	# Similarity: 649/2141 (30.3%)
# Gaps: 660/2105 (31.4%)	# Gaps: 894/2141 (41.8%)
# Score: 2977.0	# Score: 1125.5
InvH_S x InvH_E1	InvH_S x InvH_E2
Length: 149	# Length: 159
# Identity: 35/149 (23.5%)	# Identity: 24/159 (15.1%)
# Similarity: 49/149 (32.9%)	# Similarity: 48/159 (30.2%)
# Gaps: 54/149 (36.2%)	# Gaps: 71/159 (44.7%)
# Score: 111.0	# Score: 84.0

Figura 1. Resultados simplificados do alinhamento, no programa EMBOSS Needle, das proteínas pré-selecionadas *Host colonization factor* (ShdA), *AIDA transporter-like protein* (AIDA) e *Cell adherence-invasion protein* (InvH) com a primeira e última sequências protéicas de *E. coli* identificadas no alinhamento BLASTp. _S corresponde a proteína de *Salmonella*, _E1, a primeira proteína de *E. coli* identificada no alinhamento BLASTp e _E2, a última proteína de *E. coli* identificada no alinhamento BLASTp.

Após o alinhamento no EMBOSS Needle, as proteínas ShdA e AIDA foram excluídas em vista dos resultados de similaridade obtidos, e também, por não se incluírem nos demais requisitos pré-determinados para a escolha do alvo. Desse modo, a proteína InvH de *Salmonella* teve sua sequência de aminoácidos submetida aos programas Emini (EMINI et al., 1985), algoritmo de predição da acessibilidade de superfície da proteína, e BepiPred (LARSEN; NIELSEN, 2006), ferramenta que prediz a localização de epítomos lineares de células B em uma determinada sequência. Essas regiões contínuas de aminoácidos são locais específicos de um antígeno nos quais os anticorpos podem se ligar. Desse modo, a presença de epítomos de linfócitos B em uma determinada proteína permite inferir que essa região é passível de reconhecimento, seja por um anticorpo ou por um receptor de linfócito B e, portanto, a proteína é capaz de induzir resposta imune humoral (PETERS et al., 2005). As Fig. 2 e 3 apresentam os dados obtidos após análise da sequência de InvH nos programas Emini e BepiPred, respectivamente.

A

```
MKKFYSCLPVFLIGCAQVPLPSSVSKPVQQPGAQKEQLANANSIDECQSLPYVPSDLAKNKSLSNQNADNSASK  
NSAISSSIFCEKRYKQTKEQALTFFQEHFQYMRSEDEEQMLMTEFKKVLLEPGSKNLSIYQTLAAHERLQS
```

B

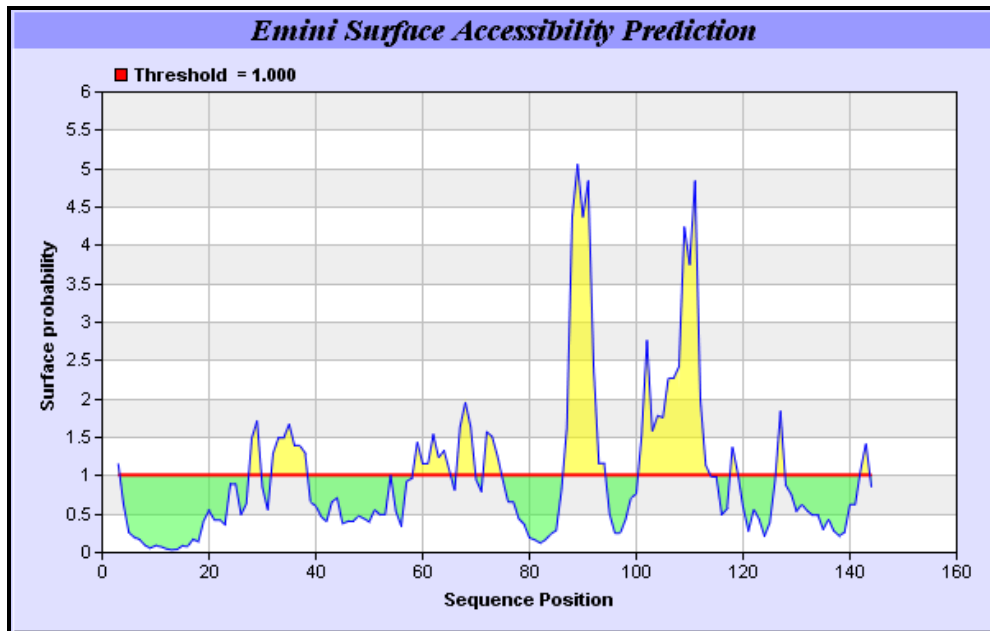


Figura 2. Resultado da predição de acessibilidade de superfície da sequência da proteína *Cell adherence-invasion protein* (InvH) de *Salmonella* através do programa Emini. **A.** Sequência de InvH submetida à análise. Marcados em cinza estão os aminoácidos expostos. **B.** Gráfico ilustrando a pontuação dos aminoácidos que estão expostos superficialmente (região amarela) ou não (região verde), sendo que as pontuações acima do limiar (linha vermelha) caracterizam a exposição.

A

```
MKKFYSLPVFLLIGCAQVPLPSSVSKPVQQPGAQKEQLANANSIDECQSLPYVPSDLAKNKSLSNQNADNSASK  
NSAISSSIFCEKYKQTKEQALTFFQEHPQYMRSKEDEEQLMTEFKKVLLEPGSKNLSIYQTLLAAHERLQS
```

B

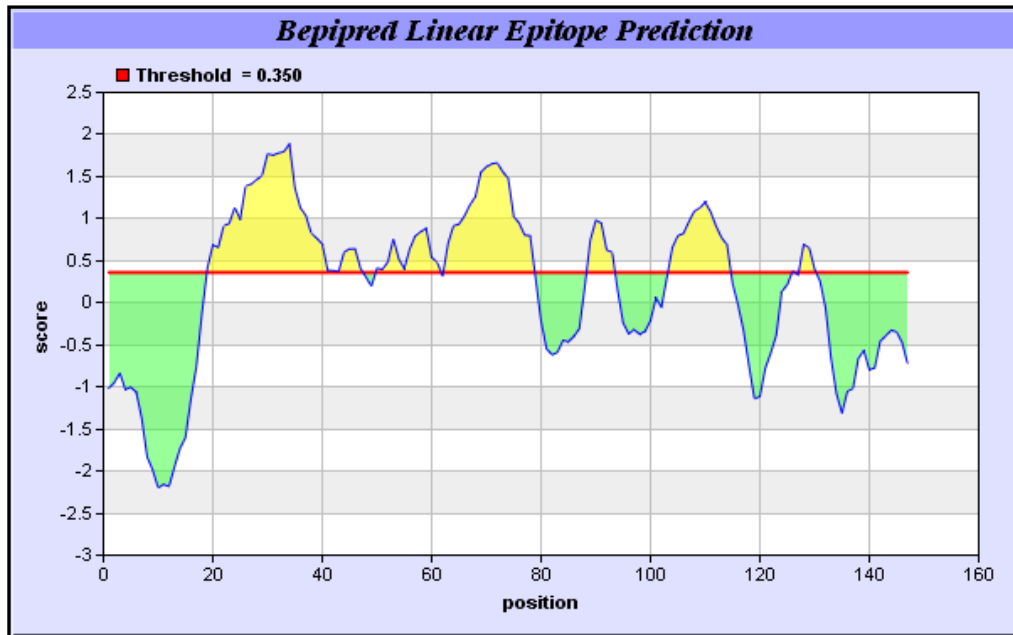


Figura 3. Resultado da predição de localização de epítomos lineares de células B na sequência da proteína *Cell adherence-invasion protein* (InvH) de *Salmonella* através do programa BepiPred. **A.** Sequência de InvH submetida à análise. Marcados em cinza estão os aminoácidos pertencentes à epítomos de linfócitos B. **B.** Gráfico ilustrando a pontuação dos aminoácidos que estão presentes (região amarela) ou não (região verde) em epítomos, sendo que as pontuações acima do limiar (linha vermelha) indicam a presença.

Por fim, a sequência protéica de InvH foi analisada através de um alinhamento múltiplo pelo Clustal Omega, onde, novamente, foi confrontada com as sequências de *E. coli* 1 e 2. Os resultados gerados por esse alinhamento (Fig. 4) permitiram identificar regiões da proteína InvH de *Salmonella* que não eram presentes nas proteínas de *E. coli*. Ainda, se os epítomos de linfócitos B identificados pelo BepiPred forem considerados, é

possível definir regiões específicas da proteína que facilitaríamos o desenvolvimento de anticorpos para sua detecção. Tais epítomos compreendem as seguintes sequências de aminoácidos: VSKPVQQPGAQK, SLPYVPSDL e ADNSA.

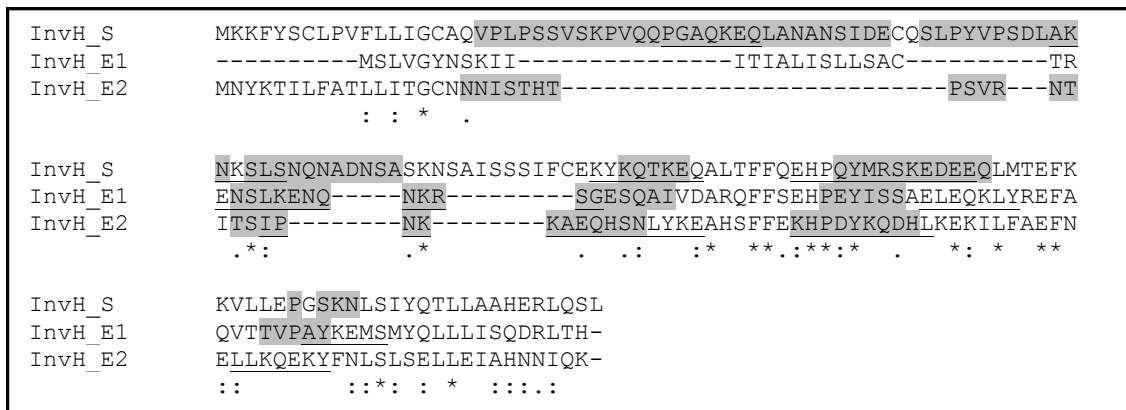


Figura 4. Resultados simplificados do alinhamento múltiplo, no programa Clustal Omega, da proteína *Cell adherence-invasion protein* (InvH) com a primeira e última sequências protéicas de *E. coli* identificadas no alinhamento BLASTp. *_S* corresponde a proteína de *Salmonella*, *_E1* a primeira proteína de *E. coli* identificada no alinhamento BLASTp e *_E2* a última proteína de *E. coli* identificada no alinhamento BLASTp. Aminoácidos marcados em cinza correspondem aos epítomos lineares preditos pelo BepiPred e sublinhados, aos aminoácidos mais expostos de acordo com Emini. * (asterisco) indica posições onde o aminoácido é totalmente conservado entre as sequências. : (dois pontos) indica conservação de aminoácidos de propriedades fortemente semelhantes. . (ponto) indica conservação de aminoácidos de propriedades possivelmente diferentes.

A interpretação dos resultados produzidos a partir das análises *in silico* descritas sugere que a proteína *Cell adherence-invasion protein* (InvH), codificada pelo gene *invH* de *Salmonella*, possui os pré-requisitos desejáveis a um antígeno-alvo.

A proteína InvH, originalmente identificada como sendo uma proteína associada à invasão por *Salmonella*, é uma proteína estrutural, cujo gene é parte integrante da região do genoma chamada Ilha de Patogenicidade 1 de

Salmonella (*Salmonella Pathogenicity Island 1* - SPI 1). Tal região é responsável pela síntese de diversas proteínas que formam, em conjunto, uma complexa estrutura molecular para invasão das células hospedeiras (DARWIN; MILLER, 1999; BAÜMLER et al., 1998).

Análises dos mecanismos de patogenicidade de *Salmonella* revelam a participação da proteína InvH no ancoramento e invasão das células do hospedeiro. Estudos com mutações no gene *invH* relatam a diminuição do poder de invasão *in vitro* e *in vivo* (UZZAU et al., 2001; WATSON et al., 1998; WATSON, et al., 1995) e, embora a formação do complexo da agulha seja possível mesmo na ausência de InvH (SUKHAN et al., 2001), sua localização na membrana externa é necessária para a correta alocação de outras proteínas formadoras do complexo e, por consequência, para o aumento da capacidade invasiva da bactéria (GALAM; WATZ, 2006; PUCCIARELLI; PORTILLO, 2003; KIMBROUGH; MILLER, 2002; CRAGO; KORONAKIS, 1998).

Apesar da grande semelhança genômica entre o gênero *Salmonella* e outras bactérias, como *Klebsiella spp.* e *E. coli*, as bactérias do gênero *Salmonella* possuem alguns poucos genes exclusivos, tais como os que codificam proteínas exportadas pelo sistema de secreção tipo III (TTSS), ou os da família *inv* e *prg*, que estão associados à patogênese. Estes genes exclusivos foram identificados após o sequenciamento do genoma de *Salmonella* Typhimurium str. LT2 (McCLELLAND et al., 2001).

A origem desses genes pode ser explicada de duas maneiras: *Salmonella* divergiu das demais espécies adquirindo novos genes há mais de cem milhões de anos, quando *Salmonella* e *E. coli* partilhavam um ancestral comum, ou *E. coli* e *Klebsiella* não sofreram grandes pressões ambientais com esses genes, a ponto de serem perdidos ou silenciados durante a evolução (NAVARRE et al., 2007).

Porwollik, Wong e McClelland (2003) analisaram a aquisição de genes por *Salmonella* tentando elucidar a evolução genômica do gênero comparando o genoma de *S. Typhimurium* str. LT2 com duas diferentes cepas de *E. coli*

(K12 e O157:H7), *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 e *Yersinia pestis* CO92. Foi possível identificar em *Salmonella* LT2, 935 genes ausentes nos outros quatro genomas analisados. Entretanto, é possível que existam genes homólogos a estes em outras cepas dos gêneros confrontados. Dos 935 genes encontrados e ditos exclusivos do gênero, apenas 56 genes foram encontrados na totalidade de cepas de *Salmonella* avaliadas no estudo (22 no total), e, somente 22 tinham função conhecida, dentre eles, os genes pertencentes ao cluster *inv*.

A alta identidade do gênero *Salmonella* com outras enterobactérias é um fator limitante na escolha de um alvo ideal para utilização em imunodiagnóstico. Além disso, os poucos genes exclusivos ainda expressam proteínas que apresentam alta similaridade com outras proteínas encontradas nessas bactérias, o que pode acarretar em resultados falso positivos e/ou diagnósticos errôneos quando na identificação de *Salmonella* em alimentos. E, por fim, é indispensável que o alvo escolhido esteja presente na maioria de sorovares de *Salmonella*, possibilitando assim um amplo espectro de detecção, visto que todos os sorovares do gênero são patogênicos ao homem.

Dessa forma, por ter conseguido, dentre as diversas proteínas pesquisadas, aliar todos os pré-requisitos estabelecidos por este trabalho, a proteína Cell adherence-invasion protein (InvH), codificada pelo gene *invH* de *Salmonella*, demonstrou grande potencial de utilização, tendo sido escolhida como proteína-alvo para o desenvolvimento de anticorpos específicos contra o gênero *Salmonella*.

5.2 Clonagem do fragmento da região codificadora do gene selecionado no vetor de expressão em *E. coli* pAE

Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), que amplificam um fragmento de 441 pb, correspondente ao gene *invH* de *Salmonella* Enteritidis foram desenhados a partir da sequência depositada no GenBank (nº de acesso 207858162). Na sequência dos *primers*, foram incluídos sítios de clivagem para

as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente, visando a clonagem direcional do gene. As sequências dos *primers* são mostradas na Tab. 3. A temperatura de anelamento ideal para esse par de *primers*, para evitar ligações inespecíficas e amplificar somente a sequência alvo foi de 60° C.

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para a amplificação do fragmento da região codificadora do gene *invH* para a obtenção de rInvH e enzimas de restrição utilizadas na clonagem.

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> 5'- 3' ^a	Enzima
InvHFor	For ^b : CGGGATCCC AGGTGCCCTCCCTT	<i>Bam</i> HI
InvHRev	Rev ^c : CGGAATTC TTATAAGGATTGCAGTC	<i>Eco</i> RI

^a Em negrito, os sítios de restrição das enzimas.

^b For: *primer forward*

^c Rev: *primer reverse*

Um fragmento compatível ao tamanho esperado para a região codificadora do gene *invH*, de aproximadamente 441 pb, foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *Salmonella* Typhimurium.

O fragmento do gene *invH* e o vetor pAE foram purificados, digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI e ligados mediante T4 DNA ligase para a construção do plasmídeo recombinante pAE/*invH* (Fig. 5).

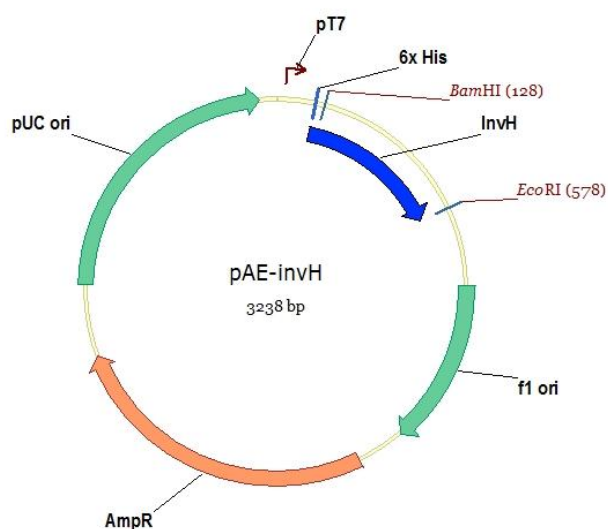


Figura 5. Mapa representativo do vetor recombinante pAE/*invH* obtido através do *software* VectorNTI 9.1.

Células de *E. coli* BL21(DE3)Top10 foram transformadas com o produto da ligação pAE/*invH*, por choque térmico, e, desta transformação, foram obtidas diversas colônias suspeitas de serem recombinantes, as quais foram submetidas à triagem pelo método de lise rápida “microprep” (Fig. 6). A digestão dos DNAs plasmidiais extraídos de quatro clones caracterizados como possíveis recombinantes (contendo o plasmídeo pAE/*invH*) (3 a 6 da Fig.6), com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI utilizadas na clonagem, gerou o padrão de bandas esperado para ambos fragmentos, ou seja, uma banda de aproximadamente 441 pb, referente ao fragmento amplificado a partir do gene *invH* (inserto), e outra banda de 2788 pb, correspondente ao vetor pAE (Fig. 7).

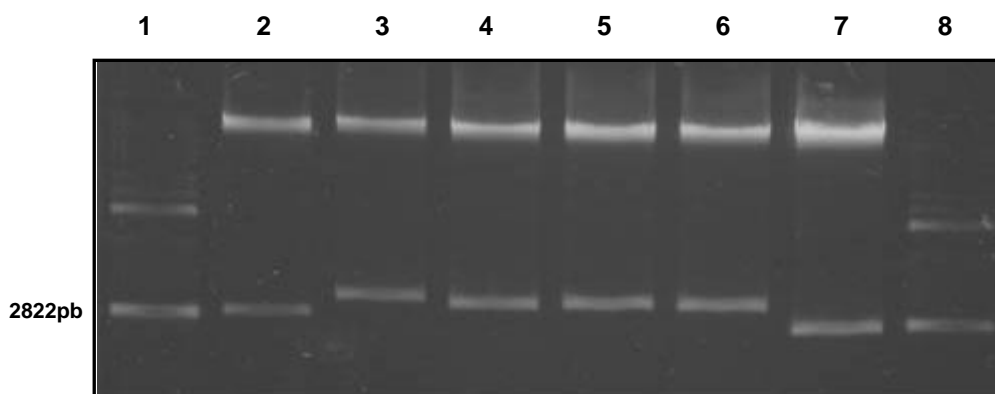


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose 0,8% do DNA plasmidial extraído, através do método de lise rápida “microprep”, das colônias de *E. coli* BL21(DE3)Top10 suspeitas de serem recombinantes (conterem o plasmídeo pAE/*invH*). Linhas 1 e 8 – DNA plasmidial do vetor pAE; 2 e 7 – DNA plasmidial extraído de colônias não recombinantes; 3 a 6 – DNA plasmidial extraído de colônias recombinantes.

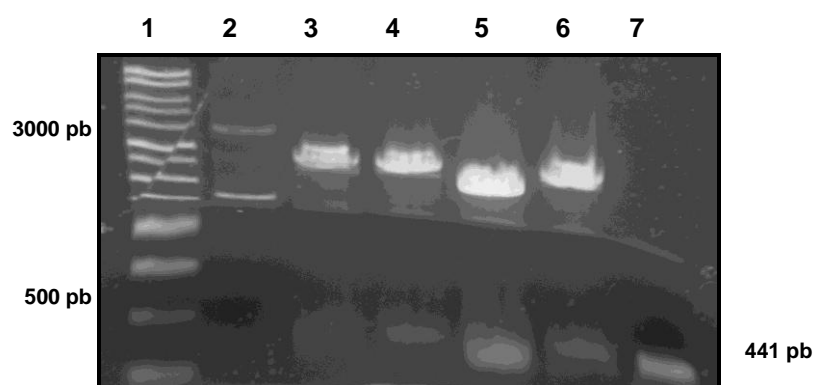


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos da digestão do DNA plasmidial, extraído dos clones de *E. coli* BL21(DE3)Top10 suspeitos de serem recombinantes, com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Eco*RI utilizadas na clonagem. Linha 1 – Marcador de 1 Kb; Linha 2 - DNA plasmidial do vetor pAE circular; Linhas 3 a 6 – Produtos digeridos dos clones contendo pAE/*invH*; Linha 7- Fragmento do gene *invH* amplificado por PCR.

A orientação, fase e sequência dos insertos foram confirmadas através do sequenciamento do vetor construído. Além disso, um fragmento de

aproximadamente 17 kDa, correspondente ao gene *invH* foi obtido através de PCR, usando os plasmídeos extraídos como DNA molde da reação (resultados não apresentados). Esses resultados demonstram que o gene *invH* foi clonado com sucesso no vetor pAE.

5.3 Expressão e purificação da proteína recombinante InvH (rInvH)

O plasmídeo pAE/*invH*, obtido após a caracterização dos clones recombinantes, foi utilizado para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) Star e pLYSS, que foram induzidas a expressão da proteína recombinante em pequena escala. Ambas as cepas expressaram com eficiência uma proteína recombinante de aproximadamente 17 kDa, massa molecular esperada para a proteína rInvH, conforme observado através de SDS-PAGE 15% (Fig. 8) e *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-cauda de histidina (Sigma) como anticorpo primário (Fig. 9).

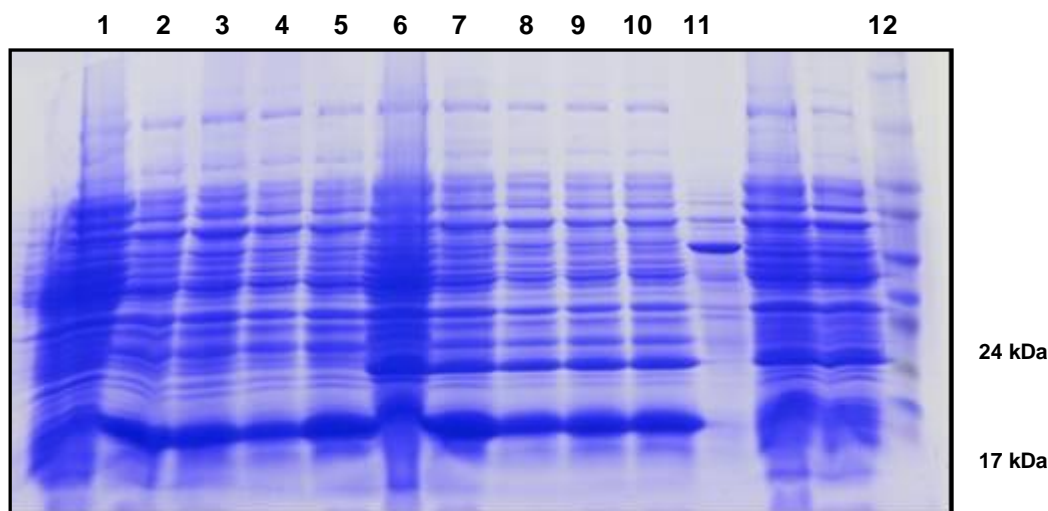


Figura 8. SDS-PAGE 15% da expressão em pequena escala da proteína recombinante rInvH em cepas de *E. coli* STAR e *E. coli* pLysS. Linhas 1 – *E. coli* STAR não transformada (controle negativo); 2 a 5 – Clones de *E. coli* STAR transformadas com pAE/*invH*; 6 – *E. coli* pLysS não transformada (controle negativo); 7 a 10 – Clones de *E. coli* pLysS transformadas com pAE/*invH*; 11- Proteína M (58 kDa); 12- Marcador de massa molecular Full Range Rainbow (GE Healthcare).



Figura 9. *Western Blotting* da expressão em pequena escala da proteína recombinante rlnvH em cepas de *E. coli* STAR e *E. coli* pLysS. Linhas 1 – *E. coli* STAR não transformada (controle negativo); 2 a 5 – Clones de *E. coli* STAR transformadas com pAE/*lnvH*; 6 – *E. coli* pLysS não transformada (controle negativo); 7 a 10 – Clones de *E. coli* pLysS transformadas com pAE/*lnvH*; 11- Proteína M (58 kD); 12- Marcador de massa molecular Full Range Rainbow (GE Healthcare).

Foi obtida, após indução da expressão em larga escala da proteína rlnvH em cepa de *E. coli* BL21(DE3) Star, uma proteína de 17 kDa solúvel em tampão Akta Wash com N-LauroylSarcosine 0,2%, a qual foi dialisada contra PBS e posteriormente purificada por cromatografia de afinidade com eficiência, verificada por SDS-PAGE 15%. As concentrações da proteína rlnvH foram estimadas através do kit BCATM Protein Assay (Pierce), obtendo-se uma concentração final de 0,2 mg.mL⁻¹ para a proteína dialisada (utilizada na imunização dos camundongos) e de 0,46 mg.mL⁻¹ para a proteína purificada em coluna de afinidade (utilizada no ELISA indireto).

5.4 Produção e titulação dos anticorpos policlonais (PAb) anti-rInVH

Após a obtenção do PAb anti-rInVH, produzido a partir dos camundongos previamente imunizados com a proteína rInVH dialisada contra PBS, os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A, e sua pureza foi confirmada por SDS-PAGE 15% (Fig. 10). Os PAb anti-rInVH purificados, após leitura em espectrofotômetro a 280 nm, apresentaram uma concentração de aproximadamente $3,4 \text{ mg.mL}^{-1}$.

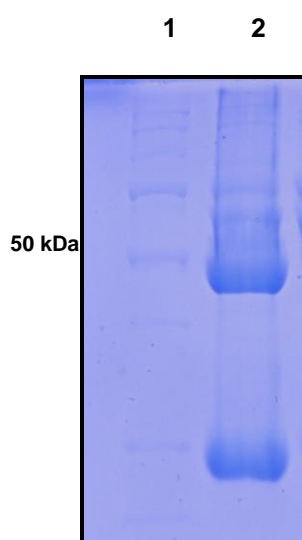


Figura 10. SDS-PAGE 15% dos anticorpos policlonais (PAb) anti-rInVH purificados. Linha 1- Marcador Precision Plus Protein (BioRad); 2- PAb anti-rInVH purificado.

A capacidade da proteína recombinante estimular a resposta imune humoral após a imunização dos camundongos foi determinada através de ELISA indireto, no qual, avaliou-se a resposta dos soros obtidos frente a proteína rInVH (100 ng por cavidade), mediante a titulação desses anticorpos (Fig. 11). O título de anticorpos do PAb purificado, expresso como a recíproca da última diluição que apresentou DO_{450} média maior ou igual a obtida pelos controles negativos, foi de 32000.

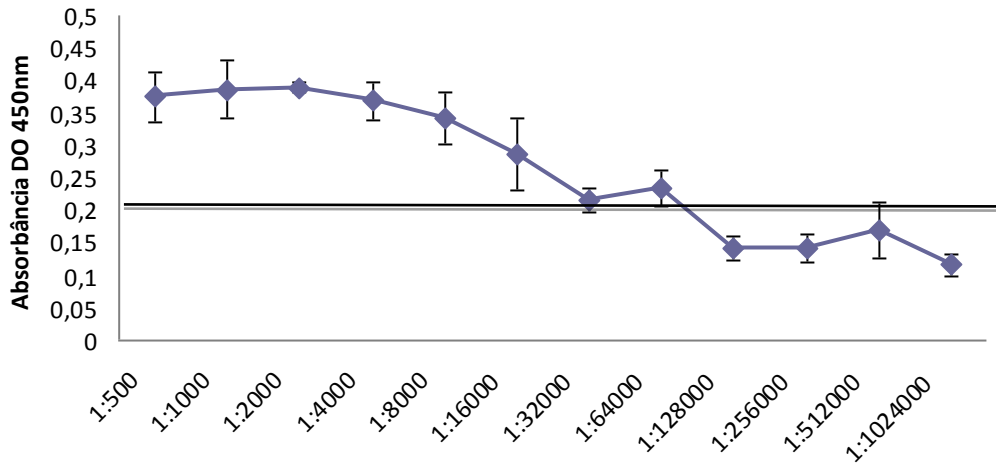


Figura 11. Curva de titulação do PAb anti-rInVH ($3,4 \text{ mg.mL}^{-1}$, diluído em base dois de 1:500 a 1:1024000) através de ELISA indireto utilizando 100 ng de rInVH como antígeno. Cada ponto representa a densidade óptica a 450 nm (DO_{450}) média de triplicatas. O valor do *cut off* (0,218597) foi calculado como a DO_{450} média obtida pelos controles negativos (reação entre rInVH e o soro pré-imune) e está representado pela linha no gráfico.

5.5 Avaliação da capacidade do PAb anti-rInVH reconhecer a proteína nativa e da sua especificidade através de ELISA indireto e *Western Blotting*

A capacidade do PAb anti-rInVH reconhecer a proteína nativa e da sua especificidade foram avaliadas através de ELISA indireto e *Western blotting*, utilizando extrato protéico de diferentes cepas de *Salmonella* e de outras bactérias, respectivamente (Tab. 1). Para os experimentos de ELISA e *Western blotting*, as bactérias foram cultivadas em caldo LB por 12 h e os cultivos tiveram suas DO_{600} ajustadas a 1,0 em tampão carbonato-bicarbonato e PBS, respectivamente. O ELISA incluiu a sensibilização das cavidades das placas com as células íntegras, submetidas à fervura a 100°C por 10 minutos e a aquecimento a 60°C por 10 minutos.

Na Fig. 12 estão demonstrados os resultados do ELISA indireto. Observou-se que o PAb anti-rInVH reagiu com todas as cepas de *Salmonella* testadas, com resultados de absorbância variando entre 0,619 (*S. Illinois*) e 0,299 (*S. Derby*), quando as cavidades da placa foram sensibilizadas com células íntegras, entre 0,501 (*S. Hadar*) e 0,297 (*S. Derby*), quando foram sensibilizadas com células fervidas a 100°C, e entre 0,363 (*S. Illinois* e *S. Rissens*) e 0,301 (*S. Infantis*), quando sensibilizadas com células aquecidas a 60°C. A absorbância do soro coletado antes da imunização dos animais (pré-imune) com a proteína recombinante, quando confrontado com as cepas de *Salmonella* variou entre 0,139 e 0,220.

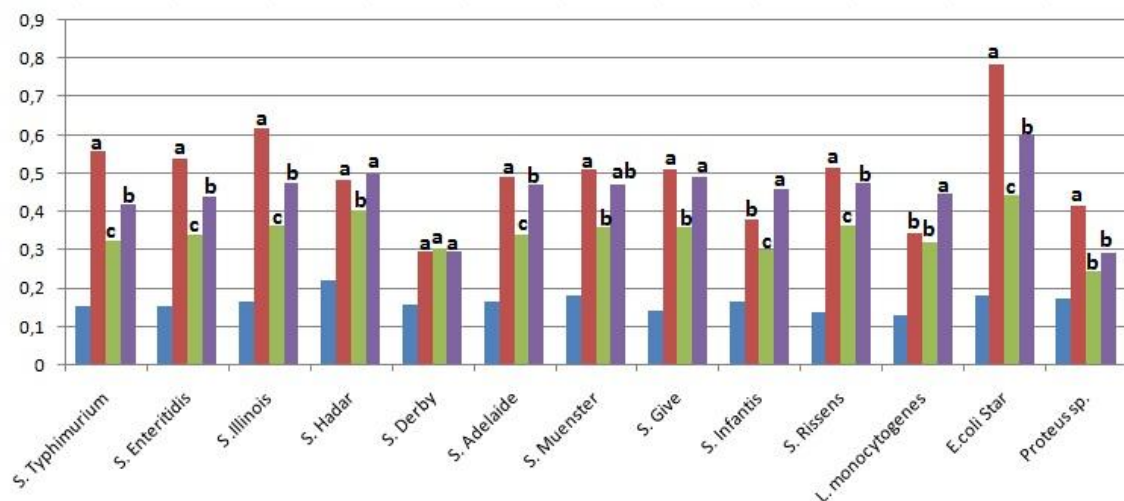


Figura 12: Reatividade do PAb anti-rInVH ($3,4 \text{ mg.mL}^{-1}$, diluído 1:1000), avaliada através de ELISA indireto, com extrato protéico de cepas de salmonelas e de outras bactérias (cultivos de 12 h com DO_{600} ajustada a 1,0). Colunas em azul: soro pré-imune diluído 1:1000 contra células íntegras; colunas em vermelho: PAb anti-rInVH contra células íntegras; colunas em verde: PAb anti-rInVH contra células aquecidas a 60°C por 10 minutos; colunas em roxo: PAb anti-rInVH contra células fervidas a 100°C por 10 minutos. As densidades ópticas (DO) das reações entre rInVH e o PAb anti-rInVH (controle positivo), rInVH e o soro pré-imune (controle negativo) e entre rInIA e o PAb anti-rInIA (controle da reação) foram de 0,427, 0,136 e 0,575, respectivamente. Os dados estão representados como DO_{450} média das triplicatas, obtidos utilizando-se o teste de Tukey. Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p < 0,05$) obtidas entre as células

íntegras, aquecidas a 60°C por 10 minutos e fervidas a 100°C por 10 minutos, de cada bactéria.

Em geral, as maiores absorvâncias foram obtidas com a reação entre o PAb e as células íntegras. Estes resultados indicam que a maioria dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos do PAb são conformacionais e que o PAb pode ser utilizado com sucesso em métodos imunológicos para a detecção de células viáveis de *Salmonella*, como a IMS. Entretanto, muitos epítomos também devem ser termoextraídos para serem reconhecidos, pois quando as proteínas da maioria das cepas de *Salmonella* avaliadas foram desnaturadas por fervura (100°C por 10 min), os valores de absorvância também foram elevados e foram estatisticamente superiores aos obtidos com as células aquecidas a 60° C. Provavelmente, o aquecimento a 60°C é suficiente para muitos epítomos conformacionais deixarem de serem reconhecidos pelos anticorpos e não é o suficiente para desnaturar totalmente epítomos que precisam ser termoextraídos.

Entre as salmonelas avaliadas, as maiores absorvâncias foram obtidas com *Salmonella* Illinois (0,619), Typhimurium (0,560) e Enteritidis (0,537), sendo as duas últimas as mais envolvidas em surtos de salmoneloses (CDC, 2011). O PAb anti-rInVH também apresentou reatividade considerável com as outras três bactérias testadas, sendo que os maiores valores de absorvância apresentados no teste ($p < 0,05$) corresponderam às reações com a cepa de *E. coli* STAR, tanto íntegras (0,784), quando submetidas a 100°C (0,604) e 60°C (0,442). As absorvâncias das reações dos anticorpos do PAb com células íntegras de salmonelas, em geral, foram superiores ($p < 0,05$) às obtidas com células íntegras de *L. monocytogenes* e *Proteus* sp. Entretanto, em geral, quando as células de salmonelas e de *L. monocytogenes* e *Proteus* sp foram aquecidas a 100 e 60°C, não houve diferença significativa entre as absorvâncias das reações com os anticorpos do PAb (dados não mostrados). Ou seja, mais uma vez foi observado que os melhores resultados foram obtidos utilizando células íntegras.

Para identificar a massa molecular da proteína a qual o PAb anti-rInvH reconhece, avaliar a capacidade dos anticorpos reconhecerem a InvH nas salmonelas e avaliar sua especificidade e a capacidade do PAb reconhecer a proteína na forma linear, bem como a expressão da proteína nas cepas testadas, foi realizado um *Western blotting*.

O PAb anti-rInvH demonstrou forte reatividade com a proteína recombinante, contudo, apenas uma das cepas de *Salmonella* testadas (*Salmonella* Derby) apresentou o padrão de banda esperado ao reconhecimento da proteína InvH nativa (uma banda de aproximadamente 17 kDa) (Fig. 13), sugerindo que o PAb não é capaz de reconhecer a proteína InvH na forma linear. Este resultado é corroborado pelo obtido através do ELISA indireto, onde as maiores absorvâncias ($p < 0,05$), em geral, foram obtidas pela reação dos anticorpos do PAb com as células íntegras de salmonelas, ou seja, com epítomos conformacionais.

Outra hipótese para esse resultado é que tenha ocorrido uma baixa, ou até mesmo a ausência da expressão dessa proteína nas demais cepas de *Salmonella* avaliadas. Acredita-se que a expressão de uma série de proteínas bacterianas se dá a partir de interações com os tecidos do hospedeiro durante a infecção, e, em virtude disso, é possível que InvH, por ser uma proteína associada a fatores de virulência (DARWIN; MILLER, 1999; BAÜMLER et al., 1998), não seja ou não tenha sido expressa *in vitro*. O PAb anti-rInvH também reagiu, no *Western blotting*, com o extrato protéico de *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Proteus* sp.

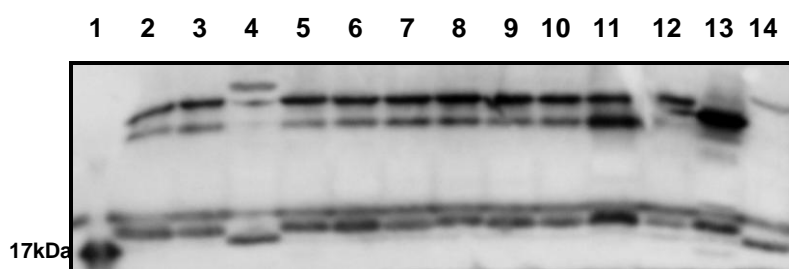


Figura 13. Reatividade do PAb anti-rInVH ($3,4 \text{ mg.mL}^{-1}$, diluído 1:1000), avaliada através de *Western blotting*, com extrato protéico de cepas de salmonelas e de outras bactérias (cultivos de 12 h com $D.O_{600}$ ajustada a 1,0). Linha 1- Proteína rInVH (controle positivo); 2- *Salmonella* Typhimurium; 3- *S. Hadar*; 4- *S. Derby*; 5- *S. Illinois*; 6- *S. Enteritidis*; 7- *S. Give*; 8- *S. Infantis*; 9- *S. Muenster*; 10- *S. Rissens*; 11- *S. Adelaide*; 12- *Listeria monocytogenes*; 13- *E. coli* STAR; 14- *Proteus* sp.

A reatividade do PAb anti-rInVH com extrato protéico de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Proteus* sp, observada no ELISA indireto, pode ter ocorrido devido a semelhança antigênica da proteína InvH de *Salmonella* com as dessas bactérias. Entretanto, a elevada reatividade do PAb anti-rInVH com a cepa de *E.coli* STAR no ELISA indireto e com outras proteínas no *Western blotting*, evidencia que houve produção de anticorpos contra proteínas da bactéria na qual a proteína recombinante foi expressa. Acredita-se que esse resultado se deve ao fato de que os animais foram imunizados com rInVH não totalmente purificada, e, em virtude disso, é possível que proteínas de *E.coli* STAR remanescentes da lise celular tenham sido inoculadas junto a rInVH.

Observou-se também que ocorreram reações inespecíficas entre os anticorpos e outras proteínas, não só de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Proteus* sp. como também de salmonelas. Isso pode ter ocorrido devido à utilização de anticorpos policlonais em testes de alta sensibilidade como o ELISA e *Western blotting*. Pode ter ocorrido também devido ao PAb anti-rInVH apresentar uma diversidade de anticorpos capazes de ligar-se com afinidade a diferentes epítomos presentes em proteínas dessas cepas, devido a ocorrência de determinantes antigênicos similares a InvH ou devido ao fato das proteínas de *E. coli* inoculadas estarem presentes ou serem semelhantes a outras

encontradas nas cepas avaliadas. Estes resultados corroboram com os obtidos por outros testes ELISA utilizando anticorpos policlonais para detecção de *Salmonella*, nos quais houve reações inespecíficas devido à semelhança antigênica com outros gêneros de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, reduzindo a especificidade do teste (OLIVEIRA et al., 1997; KEITH, 1997).

5.6 Sensibilização das microesferas magnéticas com o PAb

A quantidade de PAb anti-rInVH adsorvido por miligrama de microesferas foi de aproximadamente 0,6 mg, o que corresponde a adsorção de cerca de 54% da quantidade inicial do anticorpo utilizado na sensibilização.

5.7 Limite de detecção da PCR associada à IMS em cultivos puros de *Salmonella* Typhimurium

PCR é um método sensível, rápido e específico, e, dentre a grande diversidade de métodos moleculares disponíveis atualmente, demonstra ser uma alternativa acessível para a detecção rápida de *Salmonella* em alimentos. Diversas PCRs já foram desenvolvidas para detecção do patógeno em alimentos (MOREIRA et al., 2009; MOREIRA et al., 2008, CHIU et al., 2005; MALORNY et al., 2003; ZIEMER; STEADHAM, 2003; FERRETTI et al., 2001), entretanto, algumas apresentam limitações, como por exemplo, a ocorrência de amplificação de DNA de outras bactérias ou a ineficiência em conseguir identificar todos os sorovares de *Salmonella* testados.

A técnica de amplificação por PCR é extremamente sensível, permitindo a detecção da sequência alvo mesmo em baixas concentrações do micro-organismo. Durante a reação de PCR, a sequência de DNA é amplificada exponencialmente, ou seja, é possível obter bilhões de cópias da sequência desejada a partir de uma única cópia de DNA.

Embora a sensibilidade e especificidade da técnica sejam elevadas, diversos fatores podem reduzir drasticamente essas características, como, por exemplo, a presença de inibidores da reação. Spanova (2003) classifica esses inibidores como substâncias orgânicas e inorgânicas, a exemplo de detergentes, antibióticos, componentes fenólicos, enzimas, polissacarídeos, ácidos graxos, proteínas e sais, que podem gerar resultados falso-negativos, reduzindo a sensibilidade da técnica. Desse modo, a associação da técnica a IMS evita resultados falsos negativos, justamente por separar e concentrar as células alvo dos possíveis inibidores da reação.

Neste teste, as microesferas sensibilizadas com o PAb anti-rInvH foram utilizadas para determinar o limite de detecção da IMS associada a PCR e a plaqueamento em ágar seletivo, ou seja, o número mínimo de salmonelas necessário para se obter a amplificação do DNA por PCR e o crescimento de colônias no plaqueamento em ágar XLD, a partir de diluições de um cultivo puro de *S. Typhimurium*.

Quando a IMS foi associada ao plaqueamento em ágar seletivo, o limite de detecção foi de 10^3 UFC. mL⁻¹ e foi obtido em aproximadamente 18 h. Já, quando associada a PCR (Fig. 14), foi possível obter a amplificação do DNA a partir de 10^4 UFC.mL⁻¹ em 6 h.

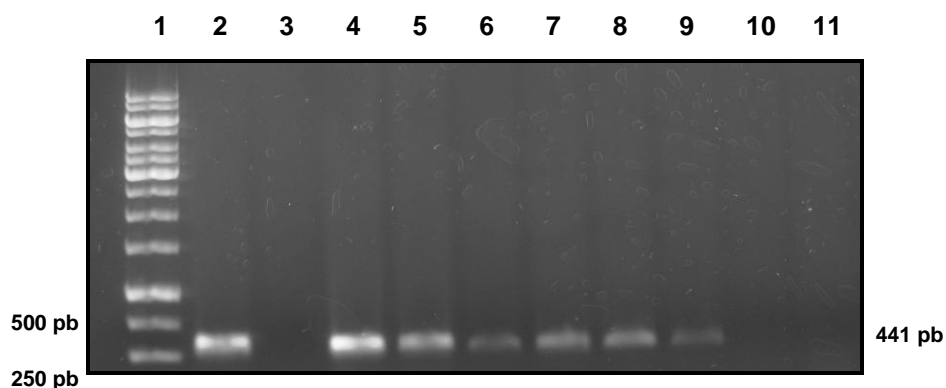


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos amplificados com o *primer invH* e DNAs de *S. Typhimurium* capturadas pelas microesferas a partir do cultivo puro. Linha 1- Marcador 1 kb; 2- Controle positivo (DNA de *S. Typhimurium*); 3- Controle negativo (mix de reagentes e *primers* sem DNA); 4- 10^9 UFC.mL⁻¹; 5- 10^8 UFC.mL⁻¹; 6- 10^7 UFC.mL⁻¹; 7- 10^6 UFC.mL⁻¹; 8- 10^5 UFC.mL⁻¹; 9- 10^4 UFC.mL⁻¹; 10- 10^3 UFC.mL⁻¹; 11- 10^2 UFC.mL⁻¹.

É possível que não tenha ocorrido amplificação da *invH* nas maiores diluições de *Salmonella* devido à perda de amostra durante a extração de DNA, redução ou inibição da amplificação pela presença de *debris* celulares decorrentes da lise celular, degradação do DNA alvo e/ou *primers*, ou ainda pela inibição direta da DNA polimerase (WILSON, 1997).

Nossa metodologia conseguiu amplificar DNA a partir de 10^4 UFC.mL⁻¹ de células de *Salmonella*, sem a necessidade de uma etapa de pós enriquecimento. Resultados similares corroboram com os encontrados neste trabalho. Moreira et. al. (2008; 2009) obteve os mesmos valores quando a PCR foi realizada imediatamente após a IMS, entretanto, com a adição de uma etapa de 6 h de pós-enriquecimento em caldo BHI, foi possível aumentar o limite de detecção para 1 a 10 UFC.mL⁻¹.

A IMS foi capaz de capturar 10^3 UFC.mL⁻¹ quando associada a plaqueamento em ágar XLD. Mansfield e Forsythe (2001) capturaram 1 a 10 UFC.mL⁻¹ de células de *Salmonella* a partir de cultivos puros e Conceição (2004) e Moreira (2008) recuperaram 20 UFC.mL⁻¹, após IMS e plaqueamento em ágar XLD.

Embora o limite de detecção da PCR associada a IMS tenha sido menor do que quando associado ao plaqueamento seletivo, nossos resultados sugerem que a IMS utilizando o PAb anti-rInvH foi eficiente para concentrar e capturar salmonelas a partir de cultivos puros, e, se considerado o pequeno volume utilizado nas reações de PCR (1 μL), em comparação ao volume utilizado no plaqueamento (20 μL), o limite de detecção conseguido ainda pode ser considerado alto. Assim, para baixar o limite de detecção do método para um nível de 1 a 10 UFC.mL^{-1} , uma etapa adicional de enriquecimento entre a IMS e a PCR torna-se necessária.

Este trabalho selecionou um alvo para a produção de anticorpos para o desenvolvimento da IMS e avaliou a IMS associada a PCR, quando da utilização de microesferas magnéticas cobertas com um PAb anti-rInvH, demonstrando que o alvo parece ser adequado e a técnica eficiente na separação e concentração de *Salmonella* Typhimurium a partir de cultivos puros. Entretanto, a técnica ainda será avaliada com amostras de alimentos artificialmente e naturalmente contaminados com salmonelas e anticorpos monoclonais anti-InvH serão obtidos, visando aumentar a especificidade do método.

6. CONCLUSÕES

- A proteína InvH de *Salmonella* spp. foi selecionada após análise *in silico* e se mostrou o alvo com as melhores características para a obtenção de anticorpos específicos para bactérias desse gênero.

- A proteína rInvH expressa em *E. coli* mostrou potencial antigênico e capaz de estimular resposta imune humoral em camundongos BALB-c.

- O PAb anti-rInvH reconheceu diferentes cepas de *Salmonella*, mas reagiu inespecificamente com outras proteínas de salmonelas e com *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Proteus sp.*

- A IMS, utilizando microesferas sensibilizadas com o PAb anti-rInvH, associada a PCR foi capaz de capturar *Salmonella* Typhimurium a partir de cultivos puros em 6 h, com um limite de detecção de 10^4 UFC.mL⁻¹.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZARI, P. M.; LASCOMBE, M. B.; POLJAK, R. J. Three-dimensional structure of antibodies. **Annual Reviews of Immunology**, v. 6. p. 555–580, 1988.

BAEUMNER, A. J.; NUGEN, S. R. Trends and opportunities in food pathogen detection. **Analytical Bioanalytical Chemistry** v. 391, p. 451–454, 2008.

BAM/FDA. **Bacteriological Analytical Manual/ Food and Drug Administration**, 8th, Arlington: Association of Official Analytical Chemists. 1998.

BAÜMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; FICHT, T.A.; ADAMS, L.G. Evolution of Host Adaptation in *Salmonella enterica*. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4579–4587, 1998.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.80-84, 2004.

BOREM, A.; SANTOS, F. R. **Biotecnologia Simplificada**. Viçosa, MG: Editora Suprema; 2001.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRICKX, M.; RIJPENS, N.; GRIJSPEERDT, K. and HERMAM, L. *Salmonella* on Pig Carcasses: Positive Pigs and Cross Contamination in the Slaughterhouse. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 891-903, 2003.

BRAUN, P.; FEHLHABER, K. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the egg yolk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 25, p. 95-99, 1995.

BREMER, P. J.; FLETCHER, G. C.; OSBORNE, C. *Salmonella* in Seafood, **New Zealand Institute of Crop and Food Research Limited**, 2003.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p.2465–2467, 2000.

BRICHTA-HARHAY D.M.; GUERINI, M. N.; ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; KALCHAYANAND,N.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOMARAIE, M. *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 Contamination on Hides and Carcasses of Cull Cattle Presented for Slaughter in the United States: an Evaluation of Prevalence and Bacterial Loads by Immunomagnetic Separation and Direct Plating Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.20, p. 6289–6297, 2008.

CBS, Center for Biological Sequence Analysis, TMHMM Server. v. 2.0- Prediction of transmembrane helices in proteins. Disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>. Acesso em: fev. 2010.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention, **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Department of Health and Human Services Atlanta, Georgia, US, v.60, 2011.

CHAPMAN, P. A.; ASHTON, R. An evaluation of rapid methods for detecting *Escherichia coli* O157 on beef carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 279–285, 2003.

CHEN, P. Advances of Bioinformatics Tools Applied in Virus Epitopes Prediction. **Virologica Sinica**. Verlag Berlin Heidelberg, v. 26, p. 1-7, 2011.

CHIU, T.-H.; CHEN, T.-R.; HWANG, W.-Z.; TSEN, H.-Y. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S RNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.259-265. 2005.

CIVILINI, M.; VENUTI, F.; BERTOLDI, M.; DAMANTE, G. Recovery of *Salmonella* typhimurium from compost with the IMS-PCR method. **Waste Management Research**, v. 18, p. 572-576, 2000.

COHEN, H.J.; MECHANDA, S.M.; LIN, W. PCR Amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium, a specific method for detection of *Salmonella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p.4303-4308, 1996.

CONCEIÇÃO, R.C.S. **Detecção de *Salmonella* em produtos de frango usando a separação imunomagnética**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) DCTA, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas.

CONCEIÇÃO, R.C.S.; MOREIRA, A.N.; RAMOS, R.J.; GOULARTE, F.L.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Detection of *Salmonella* in Chicken Cuts Using Immunomagnetic Separation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 173-177, 2008.

CRAGO, A.M.; KORONAKIS, V. *Salmonella* InvG forms a ring-like multimer that requires the InvH lipoprotein for outer membrane localization. **Molecular Microbiology**, v. 30, p. 47-56, 1998.

CROCI, L.; DELIBATO, E.; VOLPE, G.; DE MEDICI, D.; PALLESCHI, G. Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1393-1396, 2004.

CUDJOE, K.S.; HAGTVEDT, T.; DAINTY, R. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, p.11-25, 1995.

DAEFLER, S.; RUSSEL, M. The *Salmonella* Typhimurium InvH protein is an outer membrane lipoprotein required for the proper localization of InvG. **Molecular Microbiology**, v. 28, p.1367–1380, 1998.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 405–428, 1999.

EMINI, E.A.; HUGHES, J.V.; PERLOW, D.S.; BOGER, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**, v.55. p. 836-9, 1985.

EROL, I.; KLEER, J.; HILDEBRANDT, G.; YURTYERI, A. Coupling of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the rapid detection of salmonellae in minced meat and chicken giblets. **Berl Und Munch Tierarztl. Wochenschr**, v. 112, p. 100-103, 1999.

EVRENDILEK, G. A.; RICHTER, E. R.; CHISM, G. W. Concurrent detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* from a single enrichment in 24 h. **Journal of Food Safety**, v. 21, p. 75–86, 2001.

FACH, P.; DILASSER, F.; GROUT, J.; TACHE, J. Evaluation of a polymerase chain reaction based test for detecting *Salmonella* spp, in foods samples: Probable *Salmonella* spp. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1387-1393, 1999.

FAVRIN, S.J., JASSIM, S.A., GRIFFITHS, M.W. Development and Optimization of a novel immunomagnetic separation – bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.217-224, 2001.

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

FINN, R.D.; MISTRY, J.; TATE, J.; COGGIL, P.; HEGER, A.; POLLINGTON, J.E.; GAVIN, O.L.; GUNESEKARAN, P.; CERIC, G.; FORSLUND, K.; HOLM, L.; SONNHAMMER, E.L.; EDDY, S.R.; BATEMAN, A. The Pfam protein families database. **Bateman Nucleic Acids Research**, v. 38, p.211-222, 2010.

FLUIT, A. C.; TORESMA, R.; VISSER, M. J.; AARSMAN, C. J.; POPPELIER, M. J.; KELLER, B. H.; KLAPWIJK, P.; VERHOEF, J. Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain

reaction assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1289–1293, 1993.

FORSYTHE S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre, RS: Editora Artmed; 2002.

FRANCO, G. M. B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, SP: Editora Atheneu; 2005.

GALAM, J.E.; WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**, v. 444, p. 567-573, 2006.

GASANOV, U.; HUGHES, D. and HANSBRO, P. M. Methods for the Isolation and Identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a Review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 851-875, 2005.

GOMEZ, H.F.; CLEARY, G.G. **Salmonella** 4th ed, v.1. The W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.; 1998.

GRASSL, G.A.; FINLAY, R.B. Pathogenesis of enteric Salmonella infections. **Current Opinion Gastroenterology**. v.24, p.22–26, 2008.

GUARD-PETTER, J. The Chicken, the Egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 421-430, 2001.

HAGREN, V.; VON LODE, P.; SYRIALA, A.; KORPIMAKI, T.; TUOMOLA, M.; KAUKO, O.; NURMI, J. An 8-hour system for *Salmonella* detection with immunomagnetic separation and homogeneous time-resolved fluorescence PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p.158-61, 2008.

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

HARTWIG, D.D. **Vacina recombinante de subunidade contra Leptospirose: Avaliação do Potencial Imunogênico de Lipoproteínas**. 2006. Tese (Doutorado em Biotecnologia) CDTec, UFPel. Pelotas.

HSIH, H.Y.; TSEN, H.Y. Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 1744-1750, 2001.

HUMPHREY, T. J. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Science and Society**, v. 2, p. 504-509, 2004.

JORDAN, D.; VANCOV, T.; CHOWDHURY, A.; ANDERSEN, L. M.; JURY, K.; STEVENSON, A. E.; MORRIS, S. G. The relationship between concentration of a dual marker strain of *Salmonella* Typhimurium in bovine faeces and its

probability of detection by immunomagnetic separation and culture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p.1054–1062, 2004.

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; AND DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-Rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, H 71, p. 234, 2002.

KACLIKOVA, E.; KUCHTA, T.; KAY, H.; GRAY, D. Separation of *Listeria* from cheese and enrichment media using antibody-coated microbeads and centrifugation. **Journal of Microbiology**, v. 46, p. 63–67, 2001.

KEITH, M. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of salmonellae in foods. **Journal of Food Protection**, v. 60, p.682-685, 1997.

KIMBROUGH, T.G.; MILLER, S.I. Assembly of the type III secretion needle complex of *Salmonella* Typhimurium. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 75–82, 2002.

KINGSLEY, R. A.; GHANEM, D.A.; OSORIO, N.P.; KEESTRA, M.; BERGHMAN, L.; BAUMLER, A.J. Fibronectin Binding to the *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium ShdA Autotransporter Protein Is Inhibited by a Monoclonal Antibody Recognizing the A3 Repeat. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 4931–4939, 2004.

KINGSLEY, R. A.; SANTOS, R. L.; KEESTRA, A. M.; ADAMS, L. G.; BAUMLER, A. J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. **Molecular Microbiology**, v.43, p.895–905, 2002.

KLEINER, U. Investigations on use of the EiaFoss system for rapid detection of salmonellae in meat. **Archiv Fur Lebensmittelhygiene**, v. 51, p. 46-49, 2000.

KRÜGER, A.; REDMANN, T.; KRAJEWSKI, V. Field investigations on the efficacy of a live vaccine of *Salmonella* Enteritidis in meat turkeys. Internaticional Symposium on Turkey Diseases, **Anais Berlim: German Branch of World Veterinary Poultry Association**, Berlim, p. 60, 2008.

KUMAR, H. S.; SUNIL, R.; VENUGOPAL, M. N.; KARUNASAGAR, L. Detection of *Salmonella* spp. in Tropical Seafood by Polymerase Chain Reaction, **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 91-95, 2003.

LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, 2:2, 2006.

LI, A.; ZHANG, H.; ZHANG, X.; WANG, Q.; TIAN, J.; LI,Y.; LI, J. Rapid separation and immunoassay for low levels of *Salmonella* in foods using

magnetosome-antibody complex and real-time fluorescence quantitative PCR. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 3437-43, 2010.

LI, X.M.; BOUDJELLAB, N.; ZHAO, X. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 167-177, 2000.

LIEBANA, S.; LERMO, A.; CAMPOY, S.; BARBE, J.; ALEGRET, S.; PIVIDORE, M. I. Magneto Immunoseparation of Pathogenic Bacteria and Electrochemical Magneto Genosensing of the Double-Tagged Amplicon. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 5812-5820, 2009.

MADAN, M.B.; LEENA, M.P.; TAMIL, A.S.; MADERA, M.; GOUGH, J.; ARAVIND, L.; SANKARAN, K. An updated version of DOLOP with functional assignments to predicted lipoproteins. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 2761-2773, 2006.

MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HUGAS, M.; HEUVELINK, A.; FACH, P.; ELLERBROEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, p.241-249. 2003.

MANSFIELD, L. P.; FORSYTHE, S. J. Collaborative ring-trial of Dynabeads(R) anti-*Salmonella* for immunomagnetic separation of stressed *Salmonella* cells from herbs and spices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 41-47, 1996.

MANSFIELD, L. P.; FORSYTHE, S. J. The detection of *Salmonella* serovars from animal feed and raw chicken using a combined immunomagnetic separation and ELISA method. **Food Microbiology**, v.18, p.361-366, 2001.

McCLELLAND, M.; SANDERSON, K. E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S. W.; LATREILLE, P.; COURTENAY, L.; PORWOLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, FEIYU, D.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUM, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSON, R.; WILSON, R. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2, **Nature**, v. 413, p.852-856, 2001.

MENDOÇA, M. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra InIA de *Listeria monocytogenes***. 2008. Dissertação (Mestrado em Veterinária) PPGVET, UFPel. Pelotas.

MERCANOGLU, B.; AYTAC, S. A. Immunomagnetic separation and a cultural reference method for detection of *Salmonella* spp. in foods. **Archiv Lebensmittelhyg**, v. 53, p. 43-45, 2002.

MERCANOGLU, B.; GRIFFITHS, M.W. Combination of immunomagnetic separation with real-time PCR for rapid detection of *Salmonella* in milk, ground beef, and alfalfa sprouts. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 557-61, 2005.

MINE, Y. Separation of *Salmonella* Enteritidis from experimentally contaminated liquid eggs using a hen IgY immobilized immunomagnetic separation system. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3723-3727, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**; Secretaria de Vigilância em Saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf. Acesso em: 20 out. 2010.

MOREIRA, A. N.; CONCEIÇÃO, F.R.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; RAMOS, R.J.; CARVALHAL, J.B.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J. A. G. Detection of *Salmonella* Typhimurium in Raw Meats using In-House Prepared Monoclonal Antibody Coated Magnetic Beads and PCR Assay of the fimA Gene. **Journal of Immunoassay & Immunochemistry**, v. 29, p. 58-69, 2008.

MOREIRA, A.N. **Desenvolvimento de PCR associada à separação imunomagnética para detecção de *Salmonella* Typhimurium em carnes**. 2005. Tese (Doutorado em Biotecnologia) CDTec, UFPel. Pelotas.

MOREIRA, A.N.; CONCEIÇÃO, F.R.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; DIAS, C.N.; CARVALHAL, J.B.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A.G. IMS using in-house monoclonal antibody-coated magnetic beads associated to PCR assay for detection of in raw meats. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 59-72, 2009.

MÜRMAN, L.; SANTOS M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.529-534, 2008.

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

NAVARRE, W. W.; McCLELLAND, M.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C. Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. **Genes and Development**, v. 21, p. 1456–1471, 2007.

NOTZON, A.; HELMUTH, R.; BAUER, J. Evaluation of an immunomagnetic separation-real-time PCR assay for the rapid detection of *Salmonella* in meat. **Journal of Food Protection**, v. 69, p.2896-901, 2006.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive

organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v.45, p.61-69, 2001.

OLIVEIRA, K.M.P.; NAKANOO, M.H.; HERRERO, H.; HIDROOOKA, E.Y.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Produção de anticorpos policlonais para *Salmonella* Enteritidis. **XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Rio de Janeiro, RJ, 11-15, novembro de 1997.

OLSVIK, O.; POPOVIC, T.; SKJERVE, E.; CUDJOE, K.S.; HOMES, E.; UGELSTAD, J.; UHLEN, M. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, p. 43-54, 1994.

PETERS, B.; SIDNEY, J.; BOURNE, P.; BUI, H.H.; BUUS, S.; DOH, G.; FLERI, W.; KRONENBERG, M.; KUBO, R.; LUND, O.; NEMAZZE, D.; PONOMARENKO, J. V.; SATHIAMURTY, M.; SHOENBERGER, S.P.; STEWART, S.; SURKO, P.; WAY, S. WILSON, S.; SETTE, A. The immune epitope database and analysis resource from vision to blueprint. **PLoS Biology**, v. 3, p. 379- 381, 2005.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. **World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**, Pasteur Institute, France, 1997.

PORWOLLIK, S.; WONG, R. M. Y.; McCLENLLAND, M. Evolutionary genomics of *Salmonella*: Gene acquisitions revealed by microarray analysis. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences**, v. 99, p. 8956–8961, 2002.

PUCCIARELLI, M. G.; PORTILLO, F.G.D. Protein–peptidoglycan interactions modulate the assembly of the needle complex in the *Salmonella* invasion-associated type III secretion system. **Molecular Microbiology**, v. 48, p. 573–585, 2003.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braziian Journal Medical Biological Research**, v. 37, p.1103-1109, 2004.

RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, ANVISA , Brasil.

REINDERS, R.D.; BARNA, A.; LIPMAN, L.J.A.; BIJKER, P.G.H. Comparison of the sensitivity of manual and automated immunomagnetic separation methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.1015-1020, 2002.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R. dos.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp in raw broiler parts: occurrence,

antimicrobial resistance, profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.296-299, 2007.

RIJPENS, N.; HERMAM, L.; VERECCKEN, F.; JANNES, G.; SMEDT, J.; ZUTTER, L. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 37-44, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 2959- 65, 2004.

SHINOHARA N.K.S.; BARROS V.B.; JIMENEZ S.M.C.; MACHADO E.C.L.; DUTRA R.A.F.; LIMA FILHO J.L. *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. **Ciência & saúde coletiva**, v.13, nº5 Rio de Janeiro Setembro/Outubro de 2008.

SIGRIST C.J.A.; CERUTTI L.; CASTRO E.; LANGENDIJK-GENEVAUX PS.; BULLIARD V.; BAIROCH A.; HULO N. PROSITE.; a protein domain database for functional characterization and annotation. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 161-6, 2010.

SPANOVA, A.; RITTICH, B.; HORAK, D.; LENFELD, J.; PRODELALOVA, J.; SUCIKOVA, J.; STRUMCOVA, S. Immunomagnetic separation and detection of *Salmonella* cells using newly designed carriers. **Journal of Chromatography A**, v.1009, p. 215-221. 2003.

SUKHAN, A.; KUBORI, T.; WILSON, J.; GALÁN, J. E. Genetic Analysis of Assembly of the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Type III Secretion-Associated Needle Complex. **Journal of Bacteriology**, p. 1159–1167, 2001.

TATAVARTHY, A.; PEAK, K.; VEGUILLA, W.; CUTTING, T.; HARWOOD, V.J.; ROBERTS, J.; AMUSO, P.; CATTANI, J., CANNONS, A. An accelerated method for isolation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from artificially contaminated foods, using a short preenrichment, immunomagnetic separation, and xylose-lysine-desoxycholate agar (6IX method). **Journal of Food Protection**, v.72, p. 583-90, 2009.

TEO, C.; OLIVEIRA, T. *Salmonella* spp: O ovo como veículo de transmissão e as implicações da resistência antimicrobiana para a saúde pública. **Semina: Ciências Agrárias**, v.26, p. 4-06, 2009.

TORTORA G.J.; FUNKE B.R.; CASE C.L., **Microbiologia**. Porto Alegre, RS: Editora Artmed; 2005.

TRKOV, M.; AVGUSTIN, G. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.67-75. 2003.

TRKOV, M.; MAJERIKOVA, I.; JERASEK, B.; STEFANOVICOVA, A.; RIJPENS, N.; KUCHTA, T. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v.16, p. 393-399, 1999.

USDA/ERS. **Economics of foodborne disease**: Feature. U.S. Dept. of Agriculture Economic Research Service. Disponível em: www.ers.gov/briefing/FoodborneDisease/features.htm. 2003 Acesso em: out. 2010.

UYTTENDAELE, M.; VAN HOORDE, I.; DEBEVERE, J. The use of immunomagnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p. 205–212, 2000.

UZZAU S.; BROWN D.J.; WALLIS T., RUBINO S.; LEORI G.; BERNARD S.; CASADESUS J.; PLATT D.J.; OLSEN J.E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology and Infection**, v. 2, p.229-255, 2000.

VARMA, J. K. Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks 1984-2002. **Emerging Infectious Disease**, v.11, p.943-946, 2005.

WATSON, P. R.; GALYOV, E.E.; PAULIN, S.M.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S. Mutation of *invH*, but Not *stn*, Reduces *Salmonella*-Induced Enteritis in Cattle. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1432-1438, 1998.

WATSON, P.R.; PAULIN, S.M.; BLAND, A.P.; JONES, P.W.; WALLIS, T.S. Characterization of Intestinal Invasion by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Dublin and Effect of a Mutation in the *invH* Gene. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 2143-2754, 1995.

WILSON, I.G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p.3741-3751, 1997.

YU, H; BRUNO, J. Immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* Typhimurium in foods and environmental water samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 587–592, 1996.

YU, L.S.L.; UKNALIS, J.; TU, S. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. **Journal of Immunological Methods**, v.256, p.11-18, 2001.

YU, N.Y.; LAIRD, M.R.; SPENCER, C.; BRINKMAN, F.S.L. PSORTdb--an expanded, auto-updated, user-friendly protein subcellular localization database for Bacteria and Archaea. **Nucleic Acids Research**. v.39, p.241-244, 2011.

ZIEMER, C.J.; STEADHAM, S.R. Evaluation of the specificity of *Salmonella* PCR primers using various intestinal bacterial species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p.463-469, 2003.