

ELISA DE CAPTURA UTILIZANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-INLA CONJUGADOS COM PEROXIDASE

STEFANI NATALI STOLL¹; MARCELO MENDONÇA²; RAFAEL LOPES DA
ROSA²; GUSTAVO SCHMIDT GARCIA MOREIRA²; ÂNGELA NUNES
MOREIRA²; FABRICIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³

¹Universidade Federal de Pelotas- UFPel – stefani.stoll@gmail.com

²Laboratório de Imunologia Aplicada - Biotecnologia - CDTec - UFPel -
marcelomendoncavet@yahoo.com.br; rafaelbiotec@gmail.com;
moreira.gmsg@gmail.com; angelanm@ufpel.edu.br

³PPGB - UFPel - fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é o patógeno causador da doença alimentar denominada listeriose. Esta doença apresenta elevado grau de severidade, com índices de mortalidade variando de 20 a 30%, acometendo principalmente populações de risco como pacientes imunocomprometidos, gestantes, crianças e idosos (CDC, 2011). Atualmente quinze espécies do gênero *Listeria* são conhecidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*; e outras cinco novas espécies documentadas no ano de 2014 (HALTER et al., 2013; DEN BAKKER et al., 2014). Dentre essas, apenas *L. monocytogenes* é patogênica para humanos e animais, e *L. ivanovii*, para animais (GRAVES et al., 2010).

Listeria monocytogenes pode ser encontrada em alimentos como leite e seus derivados, produtos cárneos, peixes e frutos do mar, causando preocupação na indústria alimentícia e nos órgãos de saúde pública (CDC, 2011). O método tradicional para detecção deste patógeno em alimentos e amostras de ambiente é realizado com diferentes meios de enriquecimento seletivos e testes bioquímicos, os quais tornam o processo oneroso e laborioso, podendo levar mais de 7 dias para obter o resultado final (GASANOV et al., 2005). Em vista disso, a busca de métodos de detecção mais rápidos e práticos é de interesse.

Imunoensaios utilizando anticorpos monoclonais (MAbs) para a detecção rápida de bactérias em alimentos têm como vantagem a alta especificidade, reprodutibilidade e seletividade. Anticorpos contra *L. monocytogenes* foram produzidos previamente no Laboratório de Imunologia Aplicada do Núcleo de Biotecnologia da UFPel e vêm sendo aplicados no desenvolvimento de ensaios imunológicos de detecção deste patógeno (MENDONÇA et al., 2012; STOLL et al., 2012). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de MAbs marcados *in house* no desenvolvimento de um ELISA de captura, para a rápida detecção de *L. monocytogenes* em alimentos.

2. METODOLOGIA

Cultivo e preparação das bactérias

As bactérias *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *L. innocua* (CLIP 12612) foram cultivadas em 10 mL de caldo FRASER, e *Escherichia coli* EDL933 em meio LB (Luria-Bertani), por 16h a 37°C. Em seguida, os cultivos foram centrifugados a 2.600 x g por 7 minutos a 4°C e, o *pellet* lavado uma vez com 10 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) 1X, nas mesmas condições anteriores. Ao final, metade do volume (5 mL) foram suspensos com tampão

carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6) ou PBS 1X e, ajustados para densidade óptica (DO 600 nm) igual a 2.

Desenvolvimento do ELISA de captura

Placas de 96 cavidades (MaxiSorp) foram sensibilizadas com 200 ng/cavidade do MAb-2D12 (anti-InIA) e do anticorpo policlonal anti-proteína InIA (Poli-InIA), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e incubadas por 18h a 4°C. Após sensibilização, as placas foram bloqueadas com 100 µL de albumina bovina sérica (BSA, 2%) por 1h a 37°C. Em seguida, 100 µL das bactérias diluídas em PBS 1X (DO₆₀₀ = 2) foram adicionados nas cavidades e as placas incubadas a 37°C por mais 1h. Após, MAbs anti-InIA marcados com peroxidase (MAb-2D12P e MAb-3B7P) diluídos 1:200 em PBS-T (PBS + Tween 20 0,05%) foram adicionados nas cavidades e, então, as placas incubadas por 1:30 min a 37°C. Entre cada etapa, as cavidades foram lavadas três vezes com 200 µL de PBS-T. A revelação das reações foi realizada através da adição da solução cromógena OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) em tampão fostato-citrato pH 4,0 e H₂O₂. Após 15 min de reação no escuro, a leitura da densidade óptica a 450 nm foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Biochrom, Inglaterra).

ELISA direto para controle da reação

Como controle positivo, um ELISA direto foi realizado na mesma placa do teste de ELISA de captura. Para isso, cavidades foram sensibilizadas com a proteína recombinante InIA (rInIA, 200 ng/cavidade) e *L. monocytogenes* (DO₆₀₀ = 2), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, por 18h a 4°C. No passo de adição do MAbs marcados do ELISA de captura, os mesmos foram adicionados no ELISA direto na mesma concentração. Todos os outros passos foram realizados como anteriormente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os anticorpos monoclonais anti-InIA, MAb-2D12 e MAb-3B7, marcados com peroxidase, foram capazes de reconhecer seus alvos específicos, proteína rInIA e *L. monocytogenes* (Figuras 1 e 2). A marcação dos MAbs e utilização em testes de reconhecimento de diferentes bactérias e cepas de *L. monocytogenes*, já foi demonstrado pelo nosso grupo (STOLL et al., 2012). Além disso, o formato de captura (sanduíche) utilizando os MAbs anti-InIA foi previamente comprovada em biosensor com fibras ópticas (MENDONÇA et al., 2012). Entretanto, esse formato de captura utilizando os anticorpos produzidos pelo nosso grupo, ainda não havia sido realizado por ELISA. Assim, quando o anticorpo Poli-InIA foi mobilizado na placa de ELISA para captura das bactérias e posterior detecção com MAb-2D12P, maiores absorbâncias foram verificadas para *L. monocytogenes* (Figura 1). Utilizando o MAb-2D12 na captura e o mesmo MAb marcado com peroxidase (MAb-2D12P) para detecção, visualizou-se maior especificidade contra *L. monocytogenes*. Entretanto, a utilização do MAb-3B7P como anticorpo de detecção demonstrou absorbâncias mais baixas e sinais inespecíficos com as bactérias *L. innocua* e *E. coli*.

A proteína rInIA foi utilizada como controle nos ensaios de captura. Quando a captura foi realizada com Poli-InIA e a detecção com MAb-2D12P, absorbâncias distinguíveis foram observadas com rInIA. Demonstrando, assim, que é viável utilizar a proteína recombinante como controle de reação nos ensaios com Poli-InIA como molécula de captura. Como esperado, quando o MAb-2D12 foi utilizado

tanto na captura, quanto na detecção da rInIA, o sinal foi considerado negativo, uma vez que reconhecem o mesmo epítipo da proteína. Utilizando o MAb-2D12 na captura e MAb-3B7P de detecção houve um aumento na absorbância, porém mais baixo podendo ser considerado como negativo.

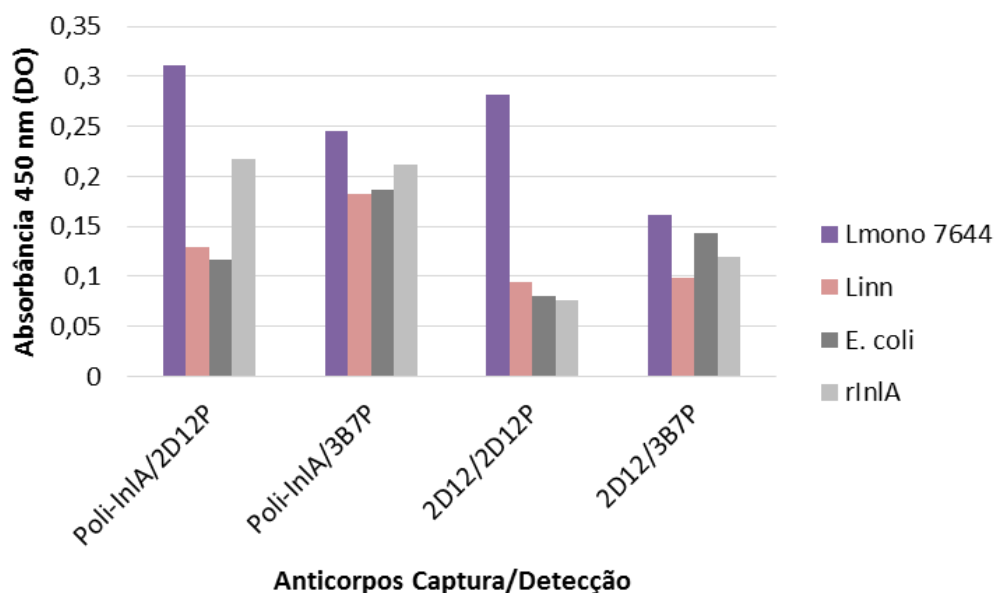


Figura 1. ELISA de captura para detecção de *L. monocytogenes* utilizando MABs anti-InIA marcados com peroxidase. Anticorpos de captura (Poli-InIA e MAb-2D12) foram sensibilizados nas cavidades. Anticorpos de detecção marcados com peroxidase, MAb-2D12P e MAb-3B7P foram diluídos 1:200 em PBS-T. *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Lmono 7644), *Listeria innocua* (Linn) e *E. coli* foram utilizadas na $DO_{600} = 2$ em PBS 1X. Como controle da reação a proteína rInIA foi utilizada.

O ELISA direto com *L. monocytogenes* e rInIA foi realizado para avaliar a reação dos MABs marcados. O MAb-3B7P e MAb-2D12P foram capazes de reconhecer a cepa patogênica *L. monocytogenes*, demonstrando absorbâncias superiores 1,0 a DO_{450} .

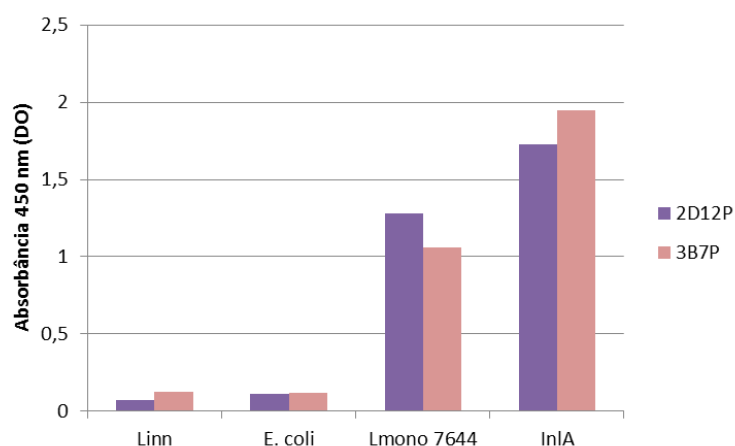


Figura 2. ELISA direto demonstrando as reações dos MABs marcados com peroxidase contra *L. monocytogenes* e rInIA.

Poucos estudos com o desenvolvimento de ELISA de captura de *Listeria* têm sido publicados. Kim *et al.* (2005) usaram anticorpos anti-flagelo de *Listeria* no desenvolvimento de ELISA de captura, entretanto, o mesmo reconhece todo o

gênero, incluindo cepas não patogênicas. Futuros ensaios com nossos MAb's avaliarão outras cepas de *Listeria*, tanto patogênicas, como não-patogênicas. Além de avaliar outras concentrações dos anticorpos e condições de incubação em vista de buscar aumento do sinal de detecção.

4. CONCLUSÕES

Os formatos utilizando Poli-InIA e 2D12 na captura e o MAb-2D12P na detecção podem ser empregados no desenvolvimento de um *kit* ELISA para a rápida detecção de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CDC, 2011. Multistate Outbreak of *Listeriosis* Associated with Jensen Farms Cantaloupe - United States, August - September 2011. **MMWR**, 60, 39, 1357-1358, 2011.

DEN BAKKER, H.C., WARCHOCKI, S., WRIGHT, E. M., ALLRED, A.F., AHLSTROM, C., MANUEL, C. S., STASIEWICZ, M.J., BURRELL, A., ROOF, S., STRAWN, L.K., FORTES, E., NIGHTINGALE, K.K., KEPHART, D. WIEDMANN, M. 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 64, 1882-1889, 2014.

GASANOV, U., HUGHES, D., HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiol. Rev.**, 29, 851-875, 2005.

GRAVES, L.M., HELSEL, L.O., STEIGERWALT, A.G., MOREY, R.E., DANESHVAR, M.I., ROOF, S.E., ORSI, R.H., FORTES, E.D., MILILLO, S.R., den BAKKER, H.C., WIEDMANN, M., SWAMINATHAN, B., SAUDERS, B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest, **Int J Syst Evol Microbiol**, 60. 6, 1280-1288, 2010.

HALTER, L.A., NEUHAUS, K., SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **Int J Syst Evol Microbiol**, 63. 641-647, 2013.

KIM, S. H., PARK M-K, KIM J-Y, CHUONG PD, LEE Y-S, YOON B-S. Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. using specific flagella antibodies. **J. Vet. Sci.** 6, 41, 2005.

MENDONÇA, M., CONRAD, N.L., CONCEIÇÃO, F.R., MOREIRA, A.N., SILVA, W.P., ALEIXO, J.A.G., BHUNIA, A.K. Highly specific fiber optic immunosensor coupled with immunomagnetic separation for detection of low levels of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. **BMC Microbiology**, 12, 275-290, 2012.

STOLL, S.N., MOREIRA, G.M.S.G., MENDONÇA, M., CONRAD, N.L., MOREIRA, A.N., CONCEIÇÃO, F.R., ALEIXO, J.A.G. Avaliação de Anticorpos Monoclonais Marcados com Peroxidase para Desenvolvimento de Teste de Detecção de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. em Alimentos. **VI Simpósio de Micro Aplicada e II Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada**. Porto Alegre- RS, 2012.