

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Produção e caracterização de anticorpos monoclonais
contra InIA de *Listeria monocytogenes*

Marcelo Mendonça

Pelotas, 2008

MARCELO MENDONÇA

**Produção e caracterização de anticorpos monoclonais
contra InIA de *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Veterinária da
Universidade Federal de Pelotas, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Veterinária.

Orientador: Wladimir Padilha da Silva
Co-orientador: José Antonio Guimarães Aleixo

Pelotas, 2008

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M539p Mendonça, Marcelo

Produção e caracterização de anticorpos
monoclonais contra InIA de *Listeria monocytogenes* /
Marcelo Mendonça . - Pelotas, 2008.

71f : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-
Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária.
Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2008,
Wladimir Padilha da Silva, Orientador; co-orientador
José Antonio Guimarães Aleixo.

1. Internalina A. 2. Imunoensaios 3. Alimentos 4.
Listeriose 5. Segurança alimentar I .Silva, Wladimir
Padilha da (orientador) II .Título.

CDD 664.07

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição, Fundação Universidade Federal de Rio Grande

Prof. Dr. Jeverson Frazzon, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, Universidade Federal de Pelotas

DEDICATÓRIA

Dedico a toda minha linda família e a minha maravilhosa Karla.

AGRADECIMENTOS

À minha querida esposa e amiga Karla, por todo amor e companheirismo, por ter entrado nesta “linda aventura” comigo. Te amo!

Aos meus pais, Leanir e Eva, pelo carinho e incentivo, em especial a minha querida mãe que me apoiou em todas as etapas de minha formação, não medindo esforços para que realizássemos nossos sonhos. Sem palavras!

Ao meu querido irmão e amigo Rodrigo, que esteve ao meu lado em todas as decisões e etapas da minha vida. Se não fosse por ele eu jamais estaria aqui. Valeu!

Aos meus sogros, que sempre nos apoiaram e incentivaram para que seguíssemos nossos estudos, sem eles nada disso estaria acontecendo, obrigado!

Ao meu orientador, Wladimir Padilha da Silva pela confiança depositada, pelo constante incentivo e ensinamentos que fez com que eu repensasse toda a minha formação acadêmica. E acima de tudo pela grande amizade e companheirismo.

Ao Professor José A. Guimarães Aleixo, meu co-orientador. Pela valiosa orientação, experiência, a passagem de seus conhecimentos, as quais contribuíram muito para meu amadurecimento pessoal e profissional.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada, Leonardo, Flávia, Carla, Neida, Juliana, Jessiane, Michele, Cláudia, pela agradável convivência e amizade.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia de Alimentos, Fernando, Élen, Carol, Márcia Araújo, Andréia, Kátia, Milena, Francine, Rodrigo, Lauri, Júlia, Márcia Jantzen pelo apoio, incentivo e amizade.

Aos grandes amigos Éverton e Gustavo que muito contribuíram não só com o trabalho, mas com dias melhores durante este processo.

Aos professores Fabrício Rochedo e Ângela Moreira, pelas valiosas contribuições em todos os processos deste trabalho e, sobretudo pela amizade.

À minha amiga Mariana Coutinho que eu sempre incomodava com alguma dúvida, sempre muito atenciosa, e por todas as longas conversas e amizade.

Aos colegas, estagiários e amigos do Centro de Biotecnologia pela amizade, convívio agradável e apoio.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

MENDONÇA, MARCELO. Universidade Federal de Pelotas, maio, 2008. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra InlA de *Listeria monocytogenes*. Professor Orientador: Wladimir Padilha da Silva. Co-orientador: José Antonio Guimarães Aleixo.

O patógeno alimentar *Listeria monocytogenes* é o agente causador da listeriose, uma doença severa que cursa com altas taxas de morbidade e de mortalidade. Os métodos convencionais empregados para detecção desta bactéria são laboriosos e onerosos, requerendo vários dias para sua identificação final. Imunoensaios usados para detecção rápida desta bactéria que utilizam anticorpos monoclonais (MAbs) tem como vantagem a alta especificidade, especialmente quando os MAbs são dirigidos contra fatores de virulência conservados nas cepas patogênicas. Entre os diversos fatores de virulência de *L. monocytogenes*, a proteína de membrana internalina A (InlA), necessária para a aderência e internalização em células não fagocíticas do hospedeiro, é uma das mais bem caracterizadas. Neste trabalho é relatado a produção e caracterização de um painel de MAbs contra a InlA. Na produção dos MAbs, camundongos isogênicos BALB/c foram imunizados com um fragmento recombinante da proteína InlA (rInlA) expresso em *Escherichia coli*. Foram gerados cinco hibridomas secretores de MAbs anti-rInlA. A constante de afinidade (K_a) dos cinco MAbs situou-se entre 7×10^7 L.mol⁻¹ e 4×10^6 L.mol⁻¹. Na caracterização por ELISA indireto e *Western blot* os MAbs reconheceram especificamente a espécie *L. monocytogenes*. No ELISA indireto com células de *L. monocytogenes* vivas ou mortas por tratamento térmico, os MAbs reconheceram somente a InlA nas bactérias que não sofreram tratamento térmico e que foram cultivadas em caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB). No *Western blot* os MAbs reconheceram uma banda de aproximadamente 88kDa nas cepas de *L. monocytogenes*, massa molecular esperada para a proteína InlA em sua forma nativa. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que os MAbs produzidos possuem potencial para serem utilizados em imunoensaios de detecção de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: Internalina A; imunoensaios; alimentos; listeriose; segurança alimentar.

ABSTRACT

MENDONÇA, MARCELO. Universidade Federal de Pelotas, may of 2008. Production and characterization of monoclonal antibodies against InlA from *Listeria monocytogenes*. Adviser: Wladimir Padilha da Silva. Co-adviser: José Antonio Guimarães Aleixo.

The food pathogen *Listeria monocytogenes* is the causative agent of listeriosis, a severe disease that courses with high rates of morbid and mortality. The conventional methods used for detection of this bacterium are laborious and expensive, requiring several days for final identification. Monoclonal antibody (Mab) based immunoassays used for rapid detection of *L. monocytogenes* have the advantage of being highly specific, particularly if the MAbs are directed against virulence factors conserved among pathogenic strains. Membrane protein internalin A (InlA) from *L. monocytogenes* is a well characterized virulence factor involved in its adhesion to and internalization in non-phagocytic cells of the host. This work reports on the production and characterization of a panel of MAbs against InlA of *L. monocytogenes*. For MAbs production, isogenic BALB/c mice were immunized with a recombinant fragment of InlA (rInlA) expressed in *Escherichia coli*. Five hybridomas secreting MAbs anti-rInlA were generated. The MAbs affinity constants (K_a) were among $7 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}$ e $4 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$. The MAbs recognized specifically the species *L. monocytogenes* by indirect ELISA and *Western blot*. In indirect ELISA using live or heat-killed *L. monocytogenes* the MAbs recognized InlA only in bacteria that were grown in Listeria enrichment broth and that were not heated. Western blot analysis revealed that MAbs recognized a band around 88kDa in the *L. monocytogenes* strains, the molecular mass expected for InlA in its native form. The MAbs produced in this study have potential for use in immunoassays for the detection of *L. monocytogenes*.

Keywords: Internalin A; immunoassays; listeriosis; foods; food safety.

Lista de Figuras

Figura 1	Diferenças na ancoragem das internalinas na parede celular	21
Figura 2	Estrutura esquemática da InIA	22
Figura 3	Estrutura 3D da InIA.....	23
Figura 4	Esquema de invasão celular de <i>L. monocytogenes</i>	25
Figura 5	Amplificação de segmento do gene <i>inIA</i> por PCR.....	42
Figura 6	Quantificação do gene <i>inIA</i> e pAE	43
Figura 7	Triagem de clones recombinantes em gel de agarose 0,8%	43
Figura 8	Digestão de clones recombinantes com as enzimas <i>BamHI</i> e <i>KpnI</i>	44
Figura 9	Mapa do vetor pAE/ <i>inIA</i>	44
Figura 10	Expressão em pequena escala de internalina recombinante.....	45
Figura 11	Expressão em larga escala de internalina recombinante.....	45
Figura 12	SDS-PAGE das amostras purificadas sem e com N-lauroylsarcosine.....	46
Figura 13	<i>Western blot</i> com anticorpo monoclonal anti-His para confirmação da purificação da proteína rInIA.....	46
Figura 14	SDS-PAGE 12% do MAb purificado	47
Figura 15	Curvas de titulação dos MAbs com a proteína rInIA (6µg.mL ⁻¹) por ELISA indireto	48
Figura 16	Reatividade dos MAbs anti-rInIA com <i>L. monocytogenes</i> 4b (clínica) cultivadas em LEB com células vivas e mortas por ELISA indireto	50
Figura 17	Reatividade dos MAbs anti-rInIA com <i>L. innocua</i> 6a cultivadas em LEB com células vivas e mortas por ELISA indireto	50
Figura 18	Reatividade por ELISA indireto dos MAbs 3C5, 5H6 e 3A12.....	51
Figura 19	<i>Dot blot</i> dos cinco MAbs com rInIA	51
Figura 20	<i>Western blot</i> com a proteína recombinante e nativa utilizando o MAb 3C5	52
Figura 21	<i>Western blot</i> com os MAbs 1H2 e 3C5	53

Lista de Tabelas

Tabela 1	Bactérias utilizadas nos experimentos com os sorotipos, nome e origem	31
Tabela 2	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação da região codificadora do fragmento do gene <i>inlA</i> , com os respectivos sítios de restrição	31
Tabela 3	Constante de afinidade dos anticorpos monoclonais anti-rInlA.....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Características do microrganismo	15
3.2 Sorotipos de <i>L. monocytogenes</i>	15
3.3 Disseminação ambiental e sua transmissão por alimentos	16
3.4 Listeriose	18
3.5 Invasão da célula do hospedeiro: papel da internalina	20
3.6 Disseminação de <i>L. monocytogenes</i> no organismo	24
3.7 Métodos rápidos de diagnóstico de <i>L. monocytogenes</i>	25
3.8 Anticorpos monoclonais contra <i>L. monocytogenes</i>	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Bactérias e condições de crescimento	30
4.2 Desenho dos <i>primers</i>	31
4.3 Extração do DNA genômico de <i>L. monocytogenes</i>	32
4.4 Amplificação do fragmento do gene <i>inlA</i> por PCR	32
4.5 Clonagem do gene <i>inlA</i> no vetor pAE	33
4.6 Seqüenciamento e análise de restrição dos vetores recombinantes	33
4.7 Expressão da proteína recombinante InlA	34
4.8 Purificação da proteína recombinante	34
4.9 Diálise rápida, concentração e quantificação da proteína recombinante	35
4.10 Análise dos proteínas por <i>Western blot</i>	35
4.11 Produção de anticorpos monoclonais (MAbs)	36
4.11.1 Imunização dos camundongos	36
4.11.2 Fusão celular	37
4.11.3 Seleção das cavidades positivas, cultivos e estocagem	37
4.11.4 Produção de ascite	38
4.11.5 Isotipagem dos MAbs	38
4.11.6 Purificação e quantificação dos MAbs	38
4.11.7 Constante de afinidade (K_a)	39

4.11.8 ELISA com a proteína nativa	40
4.11.9 <i>Dot blot</i> com a proteína recombinante	41
4.11.10 <i>Western blot</i> com a proteína nativa	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Amplificação por PCR da região do gene <i>inlA</i> de <i>L. monocytogenes</i>	42
5.2 Produção da proteína recombinante InlA	42
5.3 Purificação e quantificação da proteína rInlA	46
5.4 Produção dos anticorpos monoclonais (MAbs)	47
5.4.1 Produção e purificação dos MAbs	47
5.4.2 Isotipagem dos MAbs.....	47
5.4.3 Titulação dos MAbs purificados em ELISA indireto	47
5.4.4 Constante de afinidade	48
5.4.5 ELISA indireto com a proteína nativa.....	49
5.4.6 <i>Dot blot</i> com a proteína rInlA	51
5.4.7 <i>Western blot</i> com as proteínas recombinantes e nativa.....	51
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	59
8 REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é a única espécie do gênero *Listeria* que é motivo de preocupação para a saúde humana (GHANDI et al., 2007). Esta bactéria Gram-positiva e intracelular facultativa é capaz de causar uma séria doença invasiva, tanto em humanos quanto em animais, chamada listeriose (HOF, 2003). Desde que foi reconhecido, em 1981 (SCHLECH et al., 1983), que a listeriose é uma doença de origem alimentar, houve grandes avanços nos métodos e nos meios de cultura utilizados para detectar *L. monocytogenes*.

A distribuição ubíqua deste patógeno no ambiente, sua capacidade de se desenvolver em temperaturas de refrigeração, e seu alto potencial patogênico tornam esta bactéria uma preocupação para a segurança de alimentos refrigerados e prontos para o consumo (WHO/FAO, 2004). O principal meio de transmissão deste patógeno para homem são os alimentos contaminados (DOGANAY, 2003), e certos segmentos da população, que inclui idosos, recém-nascidos, mulheres grávidas e indivíduos com algum comprometimento do sistema imune, possuem maiores riscos de infecção (COSSART, 2007). Nesses grupos de risco as taxas de casos fatais podem chegar a 30% (WING; GREGORY, 2002), o que torna a identificação rápida e precisa deste microrganismo um grande desafio para a indústria de alimentos, órgãos fiscalizadores e pesquisadores.

Os métodos convencionais utilizados para a detecção desse microrganismo em alimentos baseiam-se no seu isolamento em meios seletivos e posterior identificação bioquímica (FARBER; PETERKIN, 1991). Por serem laboriosos, requerendo até 10 dias para diferenciar entre espécies, vários métodos alternativos, mais rápidos, têm sido propostos, dos quais, imunoenaios baseados em anticorpos monoclonais (MAbs) têm sido cada vez mais utilizados para detecção de *L. monocytogenes*, por serem simples, sensíveis e altamente específicos (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). O alvo para produção de MAbs deve ser, preferencialmente, uma proteína com distribuição uniforme na superfície do microrganismo, e cuja localização facilite o acesso do anticorpo (TULLY et al., 2006). Neste perfil, a internalina A (InlA) atende a esses requisitos por ser uma proteína extracelular específica de *L. monocytogenes*, que está covalentemente ancorada na parede celular, sendo um fator de virulência essencial para a adesão e internalização na célula hospedeira (BIERNE et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais contra a proteína InlA de *L. monocytogenes* para utilização em métodos imunológicos para detecção rápida de *L. monocytogenes* em alimentos.

2.2 Objetivos Específicos

- ◆ Clonar e expressar um fragmento do gene *inlA* de *L. monocytogenes* em *E. coli*;
- ◆ Produzir MAb's específicos contra a InlA recombinante;
- ◆ Determinar a constante de afinidade dos MAb's produzidos;
- ◆ Comprovar a especificidade dos MAb's através de ELISA e *Western blot*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características do microrganismo

As bactérias do gênero *Listeria* apresentam-se morfológicamente como bacilos curtos, Gram-positivos, possuindo aproximadamente 0,4-0,5µm de diâmetro e 1-2µm de comprimento (LOW; DONACHIE, 1997). Crescem em uma ampla faixa de temperatura, incluindo temperaturas de refrigeração, podendo multiplicar-se entre -0,4 a 45°C, com um ótimo de 37°C (JUNTTILA; NIEMELA; HIRN, 1988).

São bactérias móveis por flagelos peritríquios, os quais são expressos somente em temperaturas entre 20 e 25°C, não apresentando esta característica em temperatura de 37°C (FARBER; PETERKIN, 1991). Além disso, possui uma importante capacidade de adaptação e sobrevivência a situações ambientais adversas, como altas concentrações de sal (10%) (HAIN et al., 2007), grandes variações de pH (entre 4,3 e 9,4), e atividade de água de até 0,92 (BELL; KYRIAKIDES, 2005; ROCORT; COSSART, 1997) o que a torna muito resistente no ambiente e em alimentos, dificultando muito seu controle.

O gênero *Listeria* é constituído por seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*, das quais, *L. monocytogenes* é a única patogênica ao homem, causando a listeriose (ANTONIOLO et al., 2003; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; COSSART, 2007; HAIN et al., 2007).

L. monocytogenes é uma bactéria anaeróbia facultativa e intracelular facultativa, capaz de invadir e replicar-se em fagócitos e células epiteliais (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004). Não apresentam cápsula e não possuem a capacidade de formar esporos (FARBER; PETERKIN, 1991; HAIN et al., 2007), mesmo assim, possuem a capacidade de suportar dessecação e o congelamento, podendo suportar ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento, o que a torna um grande perigo para alimentos congelados, resfriados, ou prontos para o consumo (WHO/FAO, 2004).

3.2 Sorotipos de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes são diferenciadas por sorotipificação de acordo com sua diversidade em antígenos somáticos e flagelar. Atualmente, 13 sorotipos são

descritos para essa espécie: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7 (TORRES et al., 2005; ZHANG et al., 2007; LATHROP; BANADA; BHUNIA, 2008), entretanto, em torno de 90% das cepas isoladas em pacientes com listeriose pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (CHOU; WANG, 2006).

A grande maioria dos surtos e casos esporádicos de listeriose são devidos ao sorotipo 4b, sugerindo que este possui propriedades únicas de virulência (HAIN et al, 2007) que ainda precisam ser melhor esclarecidas. Alguns autores sugerem que isso se deve, principalmente, a este sorotipo possuir grande habilidade de se translocar através da mucosa intestinal e causar a infecção sistêmica (CZUPRYNSKI; FAITH; STEINBERG, 2002). Entretanto, é interessante destacar que em alimentos e plantas de processamento de alimentos, as cepas pertencentes ao sorogrupo 1/2 são mais prevalentes (ZHANG et al., 2007; NALÉRIO, 2007), e os relatos de casos esporádicos devidos a esse sorogrupo vem aumentando (MEAD et al., 2006; THAM et al., 2007).

No Brasil, em semelhança ao que ocorre em outros países ao redor do mundo, os sorotipos mais isolados em casos clínicos humanos são os mesmos descritos na literatura (HOFER; REIS; HOFER, 2006).

3.3 Disseminação ambiental e sua transmissão por alimentos

L. monocytogenes é um microrganismo ubíquo que está amplamente distribuído na natureza, sendo isolado de várias fontes, incluindo solo, vegetação, silagem, material fecal e água (ROCORT; COSSART, 1997; TAKARASHI et al, 2007). O fato desse patógeno resistir a condições ambientais adversas, aliado a sua alta disseminação, pode levá-lo a persistir em diversos tipos de ambientes e alimentos por muito tempo. Esse microrganismo pode ser encontrado em ambiente doméstico (SERGELIDIS et al., 1997; DUGGAN; PHILIPS, 1998; AZEVEDO et al., 2005), no ambiente de plantas de processamento de alimentos (AGUADO; VITAS; GARCÍA-JALÓN, 2004; LAER et al., 2005; LIMA et al., 2005) e, conseqüentemente, em diversos alimentos, os quais incluem produtos cárneos e derivados, leite e seus derivados, peixes e vegetais (SILVA et al., 2004; HOFER; REIS; HOFER, 2006; HONG et al., 2006).

Essa ubiquidade, aliada à tolerância a altas concentrações de sal, acidez (ROCOURT et al., 2003), atmosfera modificada, bem como sua capacidade de

multiplicação sob temperaturas de refrigeração, torna difícil a obtenção de alimentos totalmente livres desse patógeno, aumentando desta forma o riscos de contaminação de toda a cadeia alimentar (BELL; KYRIAKIDES, 2005; HAIN et al., 2007, GHANDI; CHIKINDAS, 2007). Ainda quando *L. monocytogenes* está presente inicialmente em contagens baixas no alimento, sua capacidade de crescer durante a armazenagem refrigerada, proporciona um aumento em seus níveis (WHO/FAO, 2004), que podem vir a causar casos mais sérios da infecção. Mesmo assim, na Europa e nos Estados Unidos, é exigida a ausência (*Zero Tolerance*) de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo (Ready-To-Eat) (WHO/FAO, 2004, 2005). No Brasil, a legislação vigente (BRASIL, 2001), exige a avaliação desse microrganismo apenas em queijos de média e de alta umidade e, da mesma forma que nos países europeus e nos EUA, para que esses alimentos estejam próprios para o consumo, é necessária a ausência da bactéria em 25g do produto.

Outro aspecto a ser considerado é que a não identificação de *L. monocytogenes* em um alimento antes de sua comercialização, pode resultar no recolhimento (*Recall*) do produto no comércio. Ressalta-se que o prejuízo para uma indústria com um *recall* não se restringe apenas aos custos envolvidos com o recolhimento e destruição do produto, mas também afeta, sobremaneira, a credibilidade da marca comercial e a relação de confiança estabelecida com o consumidor (ERDENLING; AINSWORTH; AUSTIN, 1999; ANTONIOLLO et al., 2003). Entre 2000 e 2002, o FDA (Food and Drug Administration) publicou 37 *recalls* de produtos contaminados com *L. monocytogenes* e, no ano de 2008, os 4 *recalls* que foram reportados devido a presença de patógenos pelo serviço de inspeção americano foram causados por *L. monocytogenes* (WHO/FAO, 2004; FSIS, 2008).

Apesar do fato de uma grande variedade de alimentos poder ser contaminado por *L. monocytogenes*, surtos e casos esporádicos de listeriose parecem estar predominantemente associados com produtos prontos para consumo (ROCOURT et al., 2003, LOGUI et al., 2003), o que deve-se, principalmente, a sua ocorrência e persistência no ambiente de plantas de processamento, o que facilita a contaminação cruzada de produtos já processados.

3.4 Listeriose

Listeriose é a infecção causada por *L. monocytogenes*, doença com graves sintomas, cujas complicações mais freqüentes ocorrem em nível de útero, sistema nervosa central, ou corrente circulatória, devido ao tropismo desse microrganismo por esses sistemas (LECUIT, 2005). O tempo de incubação é relativamente longo para uma enfermidade invasiva, girando em torno de 20 a 30 dias, (WHO/FAO, 2004), podendo chegar até 70 dias (LECUIT, 2007), o que dificulta o diagnóstico.

A listeriose ocorre, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos, idosos e mulheres grávidas (WALLS, 2005) e geralmente se manifesta em forma de septicemia, meningite ou meningo-encefalites (COSSART, 2007). Dentre os grupos de risco, indivíduos com algum comprometimento do sistema imune, como transplantados, pacientes com câncer, AIDS, diabéticos, e alcoólatras, são os mais susceptíveis à doença (WALLS, 2005; WHO/FAO, 2005).

Em mulheres grávidas, *L. monocytogenes* frequentemente causa uma bacteremia que se assemelha a uma gripe forte e culmina em aborto ou nascimento de um bebê gravemente doente (MCLAUCHLIN, 1996; GRAVES; SWAMINATHAN, 2001). As complicações específicas da listeriose durante a gravidez derivam da capacidade de *L. monocytogenes* atravessar a barreira materno-fetal, levando à abscessos placentários, corioamnionite e, por último, infecção do feto (LECUIT, 2007). Em torno de 25% dos neonatos vem a óbito (McLAUCHLIN, 1996), mas quando a identificação da infecção é realizada precocemente e o tratamento feito adequadamente, pode resultar no nascimento de crianças saudáveis (SCHLECH, 2000).

Nos Estados Unidos as taxas de listeriose para recém nascidos e idosos com mais de 60 anos são de 10 e 1,4, respectivamente, por 100 mil habitantes (SCHLECH, 2000).

Devido a todos esses fatores e à susceptibilidade de distintos grupos de risco, essa bactéria pode ser classificada como um importante agente infeccioso oportunista que, atualmente, é um problema emergente em saúde pública (Yu et al., 2004). Além disso, outros fatores também têm contribuído para o incremento dos casos e surtos dessa doença nos últimos anos, como o aumento da proporção de idosos na população; a expansão da cadeia de frio na produção de alimentos; e a

mudança dos hábitos alimentares da população, com aumento no consumo de alimentos prontos para o consumo (Gandhi et al., 2007).

Embora listeriose possa ocorrer por diferentes vias, a maioria dos casos em humanos ocorre pelo consumo de alimentos contaminados (HOFER; REIS; HOFER, 2006). Em indivíduos imunocompetentes, o curso clínico da infecção usualmente começa ao redor de 20 horas depois da ingestão do alimento contaminado (DALTON et al., 1997). Em adultos e crianças saudáveis há um baixo risco de ocorrer a doença e, quando ocorre, os sintomas são aqueles comumente associados com intoxicação alimentar, como febre, vômito, diarreia, dor de cabeça e dor muscular (TULLY et al, 2008). Entretanto, mesmo nesses grupos já foram relatados casos severos, cursando com meningite e septicemia (COSSART, 2007), nos quais, geralmente, houve ingestão de grande número do microrganismo (WHO/FAO, 2004).

Embora seja uma doença que tenha uma baixa incidência (2-15 casos por milhão da população por ano), a listeriose apresenta alta taxa de mortalidade, a qual pode alcançar 30% (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; HAIN et al., 2007). Dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), dos EUA, disponibilizados em 2000, indicam que de todos os patógenos investigados por aquele centro, *L. monocytogenes* apresentou a segunda maior taxa de mortalidade (21%), e a mais alta taxa de hospitalização (90,5%) (WHO/FAO, 2004).

Em animais a listeriose também é uma doença predominantemente de origem alimentar, freqüentemente transmitida pelo consumo de silagem de má qualidade, podendo causar abortos, natimortos e septicemia neonatal em ovinos e bovinos (LOW; DONACHIE, 1997; NIGHTINGALE; WINDHAM; WIEDMANN, 2005). *L. monocytogenes* pode, também, causar mastites e produzir grandes perdas econômicas para os produtores, por sua grande dificuldade de diagnóstico, de tratamento e eliminação do ambiente (NIGHTINGALE et al., 2004), além, ainda de proporcionar grandes riscos de transmissão para humanos, direta ou indiretamente, por contato animais contaminados e ou produtos derivados produzidos (RAWOOL et al., 2007).

3.5 Invasão da célula do hospedeiro: papel da Internalina

L. monocytogenes tem capacidade de invadir células que normalmente não são fagocíticas, como as células epiteliais, hepatócitos e células endoteliais (SCHUBERT et al., 2002; CABANES et al., 2002), enquanto a maioria dos patógenos de origem alimentar são fagocitados apenas pelos fagócitos profissionais, ou seja, pelas principais células apresentadoras de antígenos, que são as células dendríticas e os macrófagos. Uma vez dentro do organismo, *L. monocytogenes* pode vencer três barreiras significativas: a barreira intestinal epitelial, a barreira sangue cerebral, e a barreira feto placenta (WERBROUCK et al., 2006).

Para desempenhar seus mecanismos de patogenicidade *L. monocytogenes* possui inúmeros fatores de virulência, dos quais as proteínas da família internalina são as principais envolvidas na invasão das células dos hospedeiros. Duas internalinas, InlA e InlB, foram as primeiras proteínas de superfície identificadas como capazes de promover a entrada na célula do hospedeiro (LECUIT et al., 1997; TULLY et al., 2006). Essas duas proteínas são codificadas pelos genes *inlA* e *inlB*, os quais estão presentes somente na espécie *L. monocytogenes* (GLASER et al., 2001), e fazem parte de um único operon, denominado *inlAB*, regulado por uma proteína chamada de PrfA (Fator positivo de regulação A), uma proteína regulatória de vários genes responsáveis pela patogenicidade e virulência de *L. monocytogenes* (MCGANN; WIEDMANN; BOOR, 2007).

As internalinas são classificadas de acordo com a sua interação com a parede celular da bactéria (BIERNE et al., 2007). A sequência de ancoragem conhecida por promover uma união covalente das proteínas de superfície à parede celular de bactérias Gram-positivas é o motivo LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, onde X é qualquer aminoácido) (CABANES et al., 2002; TORRES et al., 2005). A primeira proteína LPXTG identificada em *L. monocytogenes* foi a InlA (Gaillard, 1991) e, atualmente, é a mais bem caracterizada e estudada das internalinas (BIERNE; COSSART, 2007). Posteriormente, dezenove outras internalinas, incluindo InlA, foram classificadas no grupo LPXTG (GLASER et al., 2001).

O motivo conservado LPXTG é seguido por um domínio hidrofóbico de aproximadamente 20 aminoácidos e uma cauda de resíduos carregados positivamente de, aproximadamente, 50 aminoácidos (CABANES et al., 2002; BIERNE et al., 2007) (Fig 1). A ligação entre o LPXTG na parede celular de *L.*

monocytogenes é catalisada por uma pequena proteína de membrana conhecida como sortase (SrtA) (COSSART; JONQUIÈRES, 2000), que cliva essa região (LPXTG) entre os resíduos de treonina e glicina, possibilitando a exposição do grupo carboxi-terminal da treonina (BIERNE et al., 2007) e sua ligação ao ácido-mesodiaminopimélico presente na parede celular bacteriana (DHAR; FAULL; SCHNEEWIND, 2000).

Diferentemente da InIA, a InIB liga-se de forma não covalente com a parede celular da bactéria através de um dipeptídeo chamado de repetição GW (Gly-Trp) (TULLY et al., 2006) (Fig. 1).

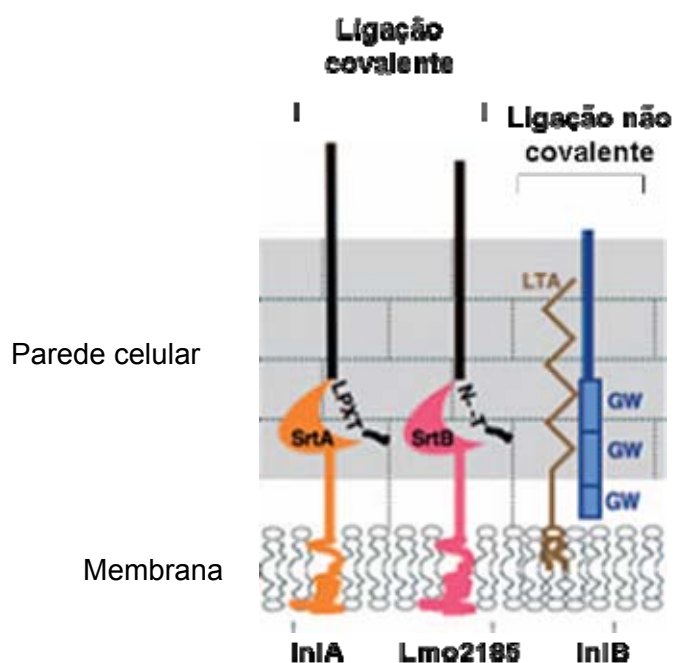


Figura 1. Diferenças na ancoragem das internalinas na parede celular.

Fonte: Adaptado de BIERNE; COSSART, 2007.

InIA é uma proteína de 88kDa capaz de realizar a adesão em células eucarióticas e induzir a sua internalização (GREGORY; SAGNIMENI; WING, 1996; SCHUBERT et al., 2002). Estruturalmente, apresenta duas distintas regiões repetidas, sendo a primeira formada por um domínio de repetições ricas em leucina (LRR) e a segunda formada por três repetições consecutivas, denominada repetição B (duas de 70 aminoácidos e uma com 49 aminoácidos) (MENGAUD et al., 1996). Essas duas regiões são separadas por uma região altamente conservada, a região inter-repetição (IR) (SCHUBERT et al., 2001) (Fig. 2).

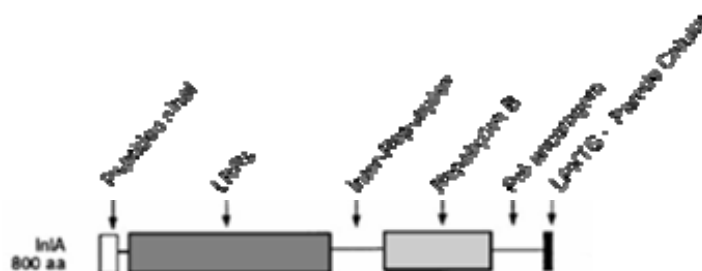


Figura 2. Estrutura esquemática da InlA.
Fonte: Adaptado de MENGAUD et al., 1996b.

O domínio LRR consiste de uma repetição em *tandem* de 20-22 aminoácidos com resíduos conservados de leucina (CABANES et al., 2002). LRRs são conhecidas por apresentarem uma grande variedade de funções, como sinalização, adesão, interação com receptores-ligantes e diversas interações proteína-proteína (KAJAVA, 1998). O número de unidades repetidas leva a diferentes conformações das proteínas, por exemplo, na proteína InlA as quinze seqüências LRRs fazem com que essa apresente uma estrutura com uma curva acentuada, que possivelmente tem ligação com sua interação com as proteínas do hospedeiro (BIERNE et al., 2007) (Fig. 3).

A InlA depende, para sua entrada na célula hospedeira, da interação com uma proteína presente nas células de mamíferos, denominada de E-caderina (Ecad), uma glicoproteína transmembrana necessária para aderência e formação das células epiteliais (LECUIT et al., 1999). A Ecad possui cinco domínios extracelulares (Ectodominios, EC1-EC5) e um domínio intracitoplasmático que regula a adesão célula-célula (MENGAUD et al., 1996; IRETON, 2007). A InlA reconhece os dois primeiros domínios da Ecad (HASS et al., 2007), e tem uma espécie-especificidade que reconhece E-caderina de humanos, mas não E-caderina de ratos e de camundongos (LECUIT et al., 1999), o que põe em evidência a necessidade crítica de um modelo animal adequado para estudar os mecanismos de virulência de *L. monocytogenes*.

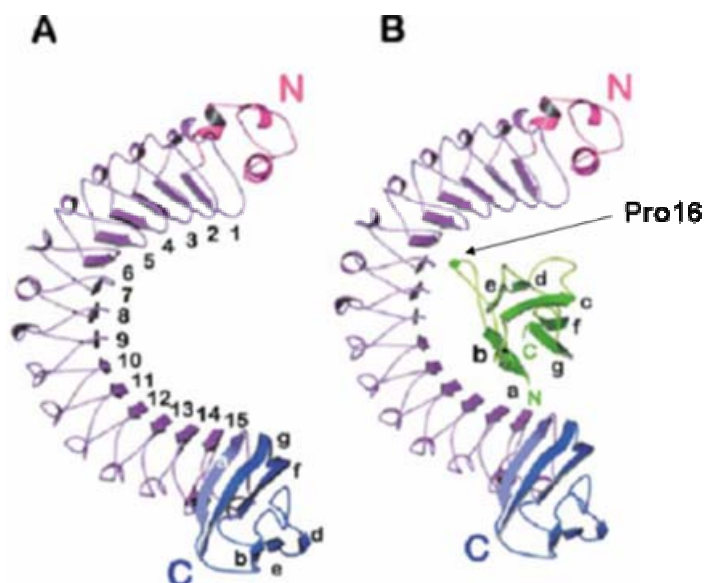


Figura 3. Estrutura 3D da InlA. A: (rosa, extremidade N-terminal), (roxo, curvatura da LRR) (azul, extremidade C-terminal); B: Complexo InlA/E-caderina (verde, E-caderina).

Fonte: Adaptado de SCHUBERT et al., 2002.

Estudos revelaram que o reconhecimento específico da Ecad humana deve-se a um resíduo do aminoácido prolina presente na posição 16 na Ecad de humanos e de alguns outros mamíferos, mas ausente em células de camundongos e ratos, onde o aminoácido presente na mesma posição é um resíduo de glutamina. Isso impede a interação entre a InlA e a Ecad, tornando esses animais resistentes à infecção oral por *L. monocytogenes* (MEGAUND et al., 1996a; LECUIT et al., 1999). Entretanto, verificou-se que além dos estudos de invasão em cultivos de células Caco-2, HepG2 e THP-1 de humanos (GAILLARD et al., 1987; WERBROUCK et al., 2006) e células LCAM (células de galinhas, que codificam um Ecad homólogo ao humano) (LECUIT et al., 1997; ZHOU; JIAO, 2005), um outro modelo adequado para estudos da interação entre InlA e células epiteliais com Ecad *in vivo*, são os cobaios, haja vista que nessas espécies a prolina também está presente na posição 16 da Ecad (LECUIT et al. 1999).

Pelo que foi descrito, o gene *inlA* é considerado um marcador molecular adequado para *L. monocytogenes*, tendo em vista que é específico e está sempre presente, independentemente da origem, sorotipo e virulência da cepa (POYART et al., 1996; GLASER et al., 2001). Além disso, é expresso em nível basal, havendo correlação direta entre sua expressão e capacidade de invasão do microrganismo na célula do hospedeiro (MENGAUD et al., 1996b). Destaca-se, também, que o elevado

número de cópias e a ampla distribuição da InIA na superfície celular de *L. monocytogenes* fazem desta proteína um alvo potencial para ensaios imunológicos (HEARTY et al., 2006).

3.6 Disseminação de *L. monocytogenes* no organismo

Na maioria dos indivíduos, a invasão por *L. monocytogenes* pode ser controlada pelo sistema imune, porém, se a infecção não for controlada por uma adequada resposta imunológica, a proliferação do microrganismo pode resultar na liberação de bactérias na circulação e num sistema de sucessivas invasões para os mais diversos sítios, principalmente, sistema nervoso central, útero e feto (FARBER; PETERKIN, 1991).

Após a invasão das células epiteliais do intestino, *L. monocytogenes* pode ser levada aos linfonodos e, em seguida, para outros tecidos incluindo o baço e fígado, através de células dendríticas, macrófagos ou como células livres (“free *Listeria*”) (PRON et al., 2001). Para sair dos fagócitos, utiliza de sua maquinaria de virulência, formada por inúmeras proteínas, para escapar do fagossoma e, posteriormente, multiplicar-se e disseminar-se pelo organismo do hospedeiro (Fig. 4). O ciclo celular da invasão e multiplicação intracelular inclui: 1) Invasão de uma célula, utilizando a InIA ou InIB; 2) escape do fagossoma através da ação conjunta de uma hemolisina, a listeriolisina O (LLO, gene *hly*) e uma fosfolipase C, a fosfotidilinositol (PI-PLC, gene *plcA*); 3) entrada no citoplasma da célula, onde se multiplica; 4) a produção da proteína ActA (gene *actA*) que polimeriza filamentos de actina da célula hospedeira para a impulsão para célula adjacente; 5) invasão de células adjacentes; e 6) escape da dupla membrana pela ação da LLO com o auxílio de outra fosfolipase, a fosfotidilcolina (PC-PLC, gene *plcB*), reiniciando o processo de multiplicação intracelular na nova célula (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; COSSART; SANSONITE, 2004).

Os fagócitos parecem ser o meio pelo qual *L. monocytogenes* pode ser transportada para várias partes do corpo do indivíduo infectado sem ser reconhecida pelo sistema imunológico (FARBER; PETERKIN, 1991). Recentemente descobriu-se que os mastócitos têm uma importante influência no início de uma resposta de imune eficiente anti-*Listeria* (GEKARA; WEISS, 2008).

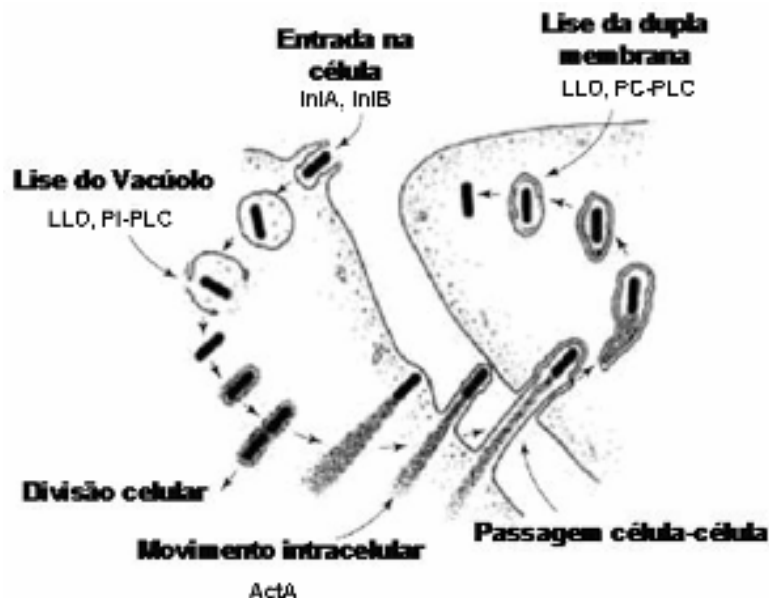


Figura 4. Esquema de invasão celular de *L. monocytogenes*.
Fonte: Adaptado de Vázquez-Boland et al., 2001.

3.7 Métodos rápidos de diagnóstico de *L. monocytogenes*

Há um crescente interesse em ensaios rápidos e que possam detectar níveis de patógenos em horas ao invés de dias, como exigido pelos métodos convencionais de cultura (PAOLI et al., 2004). Os métodos convencionais para detecção de *L. monocytogenes* em alimentos são laboriosos e apresentam custo operacional bastante elevado em função da grande variedade de materiais e da mão-de-obra envolvidos na execução das análises. Além disso requer um tempo relativamente longo para obter um resultado definitivo. São necessários, no mínimo, quatro dias para obtenção de um resultado negativo, e de 6 a 10 dias para identificação e confirmação de amostras positivas (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). A maioria dos laboratórios utiliza os métodos tradicionais baseados no uso de meios de pré-enriquecimento seletivo, enriquecimento, e crescimento em meios de cultura seletivo/diferenciais, para o isolamento de colônias viáveis, seguidos de testes bioquímicos para identificação em nível de espécie, como aqueles preconizados pela FDA/BAM, USDA e ISO 11290 (HEARTY et al., 2006). Apesar de requererem vários dias para se obter a diferenciação entre as espécies, os métodos tradicionais permanecem como *Gold Standard* (GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005; JANTZEN et al., 2006b), mas mesmo assim, ainda não são suficientemente sensíveis para detecção de baixa concentração celular proveniente de alimentos (GRAY; BHUNIA, 2005).

Em vista desses fatores, tem havido uma busca constante, particularmente pelas indústrias de alimentos, por métodos sensíveis, específicos e rápidos para a detecção desse patógeno, principalmente devido a necessidade de atendimento aos parâmetros estabelecidos pelos organismos reguladores governamentais e/ou pelo comércio internacional, bem como para liberação mais rápida de produtos perecíveis (PAOLI et al., 2004; GASANOV; HUGHES; HANSBRO, 2005). Deste modo, diversos métodos rápidos foram propostos nos últimos anos (ZHOU; JIAO, 2005; CHURCHILL; LEE; HALL, 2006; JANTZEN et al, 2006a; WANG et al., 2007; CHEN; KNABEL, 2007; AURORA et al., 2008; TULLY et al, 2008). O método proposto deve apresentar alta especificidade e sensibilidade, baixo custo operacional, redução de tempo e mão de obra envolvidos na análise e ser aplicável em vários tipos de alimentos e amostras.

Embora atualmente existam técnicas rápidas para a detecção desse microrganismo em alimentos que não utilizam reação antígeno-anticorpo e são baseadas, principalmente, na reação em cadeia da polimerase - PCR (CHEN; KNABEL, 2007) e hibridização do DNA (BUROCKI; CALL, 2003; CHURCHILL; LEE; HALL, 2006), muitos pesquisadores têm concentrado seus esforços na aplicação de métodos imunológicos para a detecção de *L. monocytogenes* (BHUNIA et al., 1991; KATHARIOU et al., 1994; DUFFY et al., 1997; ERDENLING; AINSWORTH; AUSTIN, 1999; YU et al., 2004; TULLY et al., 2006; HEO et al., 2007).

Anticorpos monoclonais (MAbs) têm sido cada vez mais utilizados devido a sua especificidade para variados antígenos, na identificação de diversos patógenos (LÜDTKE et al., 2003; VARSHNEY et al., 2007; MOREIRA et al., 2008). Os MAbs são imunoglobulinas que reagem com apenas um determinante antigênico e que são secretadas por clones de células conhecidas como hibridomas. Para a obtenção dessas células secretoras de MAbs é necessário realizar a fusão *in vitro* de linfócitos B produtores de anticorpos com células de mieloma (células de tumor de linfócitos B) (KOHLEER; MILSTEIN, 1975; HARLOW; LANE, 1988). Como os MAbs reagem com apenas um epítipo do antígeno, as principais dificuldades são obter MAbs com uma afinidade adequada para detectar pequenas quantidades do antígeno, bem como sejam específicos para a bactéria alvo.

3.8 Anticorpos monoclonais contra *L. monocytogenes*

Diversos grupos ao redor do mundo têm envidado esforços na produção de anticorpos monoclonais ou policlonais para detecção rápida e específica de *L. monocytogenes* em alimentos (HUDSON et al., 2001, LIN et al., 2006, HEO et al., 2007), em material clínico (MCLAUCHLIN et al., 1988), ou para estudo de mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência (MENGAUD et al., 1996b; DARJI et al., 1996; YU et al., 2004). Entretanto, a maioria tem demonstrado um grande número de limitações para identificação específica de *L. monocytogenes* e sua aplicação em ensaios de diagnóstico.

Diversas proteínas podem ser utilizadas para a produção de MAb, porém, o alvo adequado deve ser, preferencialmente, uma proteína de membrana que apresente distribuição uniforme na superfície da célula do microrganismo alvo, e cuja localização facilite o acesso do anticorpo.

Butman et al. (1988) produziram 15 MAb específicos para o gênero *Listeria*, os quais reagiam somente quando os extratos de células eram fervidos. Ainda em 1988, o grupo coordenado por McLauchlin utilizou dois MAb anti-*Listeria monocytogenes* para confirmação de listeriose em tecidos de necropsia e, apesar de terem obtido bons resultados em amostras clínicas, os MAb não foram capazes de reconhecer todos os sorotipos de *L. monocytogenes*, bem como apresentaram reação cruzada com *L. innocua*. Resultados semelhantes foram obtidos por Siragusa e Johnson (1990), que produziram somente um MAb, o qual reagia com *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. welshimeri*.

Skjerve, Rorvik e Olsvik, (1990) e Kim et al. (2005) adotaram a estratégia de produzir MAb anti-flagelo (flagelina) de *L. monocytogenes* para utilizá-los em um sistema de imunoseparação-magnética e ELISA sanduíche, respectivamente, entretanto, além de não reconhecer todos os sorotipos de *L. monocytogenes*, apresentaram reação cruzada com outras espécies do gênero *Listeria*.

Em 1991, Bhunia et al. obtiveram 1,680 hibridomas, depois de duas fusões celulares, e selecionaram um MAb (denominado C11E9) que reconhecia tanto *L. monocytogenes* quanto *L. innocua*, o qual foi utilizado em vários estudos posteriores (BHUNIA; JOHNSON, 1992; LATHROP et al., 2003; GENG et al., 2003; GENG et al., 2004; GRAY; BHUNIA, 2005). Já em 1992, esse mesmo grupo descreveu a

obtenção de outro MAb (EM-7G1) que foi específico para *L. monocytogenes*, o qual também foi utilizado em outros trabalhos (GENG et al., 2003; HEO et al., 2007).

Um dos primeiros estudos relatando a funcionalidade da InIA utilizou MABs para demonstrar o bloqueio da invasão de *L. monocytogenes* em células de fibroblasto, e, dessa forma, provar que essa proteína era essencial para a sua ligação à célula hospedeira e consequentemente sua internalização (MENGAUD et al., 1996b). Esses pesquisadores produziram os MABs a partir da purificação da internalina que tinha sido anteriormente produzida em uma *L. innocua* mutante (recombinante) que expressava InIA (MENGAUD et al., 1996a). Outros estudos utilizando MABs visando a avaliação da patogenicidade de *L. monocytogenes* foram realizados por Darji et al. (1996), os quais produziram anticorpos específicos contra a hemolisina LLO, e por Erdenling et al. (1999), que produziram 10 MABs para determinar a virulência de cepas isoladas de pescados, e sua atividade sobre a LLO.

Wieckowska-Szakiel et al. (2002) e Yu et al. (2004) utilizaram como alvo para a produção de MABs a proteína p60, que é uma proteína secretada e utilizada pela bactéria para sua invasão na célula hospedeira. A proteína p60 está presente em todas as espécies de *Listeria*, mas possui algumas seqüências de aminoácidos conservadas para a espécie *L. monocytogenes*, podendo, desta forma, ser utilizada para distinguir-se entre as espécies. Mesmo assim os dois MABs produzidos naqueles estudos reconhecem, além de *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Mais recentemente, um grupo da Universidade de Dublin, Irlanda (HEARTY et al., 2006), produziu um MAb anti-internalina A, cuja estratégia adotada foi utilizar como imunógeno células inteiras de *L. monocytogenes* inativadas por formalina. No processo de seleção dos MABs os autores observaram que um dos MABs produzidos reagia, por *Western blot*, com uma proteína de massa molecular aproximado da internalina A, o que foi posteriormente confirmado a partir da produção de uma proteína InIA recombinante. Esse MAb foi utilizado em ensaios posteriores com biosensores, microscopia de força atômica (AFM) e imunofluorescência através de *quantum dots*, com excelentes resultados (TULLY et al., 2006). O reconhecimento de todos os sorotipos de *L. monocytogenes* com esse MAb anti-InIA reforça a utilização da proteína InIA como um bom alvo para identificação específica de *L. monocytogenes*.

Em 2006, Lin et al. selecionaram dois MAbs que reagiam especificamente com o sorotipo 4b de *L. monocytogenes*, porém, não reconheciam outros sorotipos importantes como os do sorogrupo 1/2, que juntamente com o sorotipo 4b, são os mais relacionados a casos e surtos de listeriose.

Embora exista uma gama considerável de relatos de produção de MAbs contra *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, o sucesso em se obter MAbs específicos contra *L. monocytogenes* tem sido difícil. Isso sugere que *L. monocytogenes* não possui tantos epítomos antigênicos de superfície específicos para a espécie, e ou, que tais epítomos não são processados e apresentados de forma eficaz durante a produção e maturação *in vivo* do anticorpo (PAOLI et al, 2004). Ressalta-se que a especificidade dos métodos imunológicos disponíveis para detecção de microrganismos em alimentos depende diretamente da especificidade dos anticorpos utilizados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Bactérias e condições de crescimento

Todas as bactérias utilizadas nos experimentos foram obtidas a partir da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, provenientes de isolamentos realizadas pelo grupo de pesquisa do laboratório; adquiridas do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA); ou provindas de amostras da Fundação Oswaldo Cruz, (FioCruz, Rio de Janeiro, BR) gentilmente cedidas pelo Dr. Ernesto Hofer. Na Tabela 1, encontram-se listadas todas as cepas bacterianas utilizadas neste estudo.

L. monocytogenes e outras espécies de *Listeria* foram cultivadas em caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB, Difco®), caldo triptona de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE, Acumedia®), ou meio Luria-Bertani (LB, Difco®) por 18-24h a 37°C. Os outros gêneros de bactérias foram cultivados em caldo TSB-YE e meio LB por 24h a 37°C.

Para a clonagem e expressão das proteínas recombinantes, cepas de *Escherichia coli* comerciais foram adquiridas da empresa Invitrogen (USA). A cepa *E. coli* Top10F' foi utilizada para a construção dos vetores recombinantes, enquanto, *E.coli* BL21(DE3) pLysS foi empregada na expressão das proteínas. Ambas as cepas foram cultivadas em meio Luria-Bertani à 37°C por 18h, em meio suplementado com 100µg.mL⁻¹ de ampicilina quando necessário.

Todos os cultivos foram realizados em agitador orbital a uma velocidade de 200rpm.

Tabela 1. Bactérias utilizadas nos experimentos com sorotipos, nome e origem

Bactérias	Sorotipo	Nome	Origem do isolado
<i>L. monocytogenes</i>	4a	ATCC 19114 ^a	Bovino
<i>L. monocytogenes</i>	4d	ATCC 19117 ^a	Ovino
<i>L. monocytogenes</i>	4b	Lm10 ^b	Clínica Humana
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Lm11 ^b	Clínica Humana
<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	Lm12 ^b	Clínica Humana
<i>L. monocytogenes</i>	1c	Lm08 ^c	Alimento/Queijo
<i>L. monocytogenes</i>	1b	Lm06 ^c	Alimento/Frango
<i>L. monocytogenes</i>	4b	Lm01	Alimento/Frango
<i>L. innocua</i>	6a	Li01 ^c	Alimento/Frango
<i>L. seeligeri</i>	-	Ls02 ^c	Alimento/Frango
<i>S. enterica</i>	-	ATCC 13076 ^a	-----
<i>B. cereus</i>	-	ATCC 11778 ^a	-----
<i>S. epidermidis</i>	-	Se01 ^c	-----

a- ATCC (American Type Culture Collection); b- FioCruz (Fundação Oswaldo Cruz);
c- Laboratório de Microbiologia de Alimentos, FAEM/UFPeL.

4.2 Desenho dos *primers*

O desenho da sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) empregados para amplificação do gene *inlA* foi realizado com o auxílio do software Vector NTi 9.0 (Invitrogen) a partir da sequência do gene *inlA* depositado no banco de dados de genomas GenBank (número de acesso DQ132795). Um conjunto de oligonucleotídeos (MWG-Biotech, USA) foi desenhado para amplificar um fragmento da região codificadora do gene *inlA* que corresponde à extremidade N-terminal da proteína (Tab. 2), cujo tamanho esperado após a amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é de 906 pares de bases (pb) referentes a porção mais hidrofílica da proteína nativa. Na sequência dos *primers* foram incluídos sítios de clivagem para as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I (ambas adquiridas da Invitrogen), nas extremidades 5' e 3' do gene, e um de terminação TAG no primer *reverse*,

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados para amplificação da região codificadora do fragmento do gene *inlA*, com os respectivos sítios de restrição.

Sequência dos <i>primers</i> ^a (5'- 3')	Enzima de Restrição	Tamanho do produto
F: CGGGATCCTTTAATGCTAAGTTTCATG	<i>Bam</i> HI	906pb
R: GGGGTACCCTAAGTAAGAACCATTGCAGT	<i>Kpn</i> I	

^a Em vermelho, os sítios de restrição das enzimas
F/R: *primer forward* e *reverse*, respectivamente.

4.3 Extração de DNA genômico de *L. monocytogenes*

O DNA genômico de *L. monocytogenes* foi extraído conforme método adaptado a partir de Sambrook e Russell (2001). Inicialmente, 1,5mL de cultura de *L. monocytogenes* (ATCC 19114) foi centrifugada por 5min a 13.000rpm em temperatura ambiente. O *pellet* formado foi ressuspenso em 100μL de tampão STES [Tris-HCl 0,2M; NaCl 0,5M; SDS 0,1%; EDTA 0,01M; pH 7,6] e, então, foram adicionados à mistura aproximadamente 50μg de pérolas de vidro e 100μL de fenol-clorofórmio, a qual foi homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi coletado e a este foi adicionado etanol 100% (2X o volume inicial) e NaCl 5M (0,1X o volume inicial) e, logo em seguida, incubado a -20°C por 1h. Passado este período, foi realizada nova centrifugação a 13.000rpm por 20min. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado 2 vezes com álcool 70%, deixado secar e o DNA eluído em 40μL de tampão de eluição (Tris-EDTA, Tris-HCl 100mM pH 7,4, EDTA 10mM pH 8). Às amostras de DNA extraídas foi adicionado 1μL de RNase (10mg.mL⁻¹). A qualidade do DNA extraído foi determinada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo brometo de etídio, e as amostras foram armazenadas à -20C até o momento do uso.

4.4 Amplificação do fragmento do gene *inlA* por PCR

Um fragmento do gene *inlA* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *L. monocytogenes* (ATCC 19114). Para padronização da reação, diferentes temperaturas de anelamento, concentrações de *primers*, bem como de MgCl₂ foram testadas. A PCR foi realizada em um volume final de 25μL, contendo aproximadamente 20ng de DNA molde, *primers forward* e *reverse* [0,4μM cada], MgCl₂ [1,5mM], dNTPs [200μM], tampão PCR [1x] e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen). A reação foi realizada em termociclador Eppendorf (modelo Mastercycle Gradient) e padronizada nas seguintes condições: desnaturação inicial (94°C, 7 min) seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C, 1 min), anelamento (45°C, 1 min) e extensão (68°C, 2 min). Ao término destes 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (68°C, 7 min). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio, e purificados com kit GFXTM PCR DNA and gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com as orientações do fabricante.

4.5 Clonagem do gene *inIA* no vetor pAE

O fragmento do gene que contém a região codificadora para a proteína InIA foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*l. O vetor pAE (RAMOS et al, 2004) também foi digerido utilizando-se as mesmas enzimas de restrição e, em seguida, submetido à defosforilação com fosfatase alcalina (CIP) por 1h a 37°C. Os produtos da PCR e o vetor pAE foram purificados com o kit GFXTM PCR DNA and gel Band Purification kit e utilizados na clonagem. O produto de PCR foi inserido adjacente a uma sequência que codifica para seis resíduos de histidina, de forma a possibilitar a posterior purificação das proteínas por cromatografia de afinidade. Para a reação de ligação foi empregada a enzima T4 DNA ligase por 1h a 16°C.

Um volume de 1µL do produto da ligação foi utilizado para transformar, por eletroporação, 50µL de células de *E. coli* Top10F' (Invitrogen), as quais foram preparadas segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). As bactérias transformadas foram cultivadas em placa contendo ágar Luria-Bertani suplementado com 100µg.mL⁻¹ de ampicilina. As colônias obtidas foram analisadas quanto à presença do plasmídeo recombinante através de um processo de triagem rápida pelo método microprep (JOUGLARD et al., 2005), e aquelas selecionadas foram cultivadas em 5mL de LB líquido suplementado com 100µg.mL⁻¹ de ampicilina. Um volume de 1,5mL desse cultivo foi utilizado para extração de DNA plasmidial por meio do kit de extração de DNA plasmidial GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare).

4.6 Seqüenciamento e análise de restrição dos vetores recombinantes

Para verificar a integridade do produto de PCR, os vetores pAE/*inIA* construídos foram seqüenciados em seqüenciador MegaBACE (Amersham Biosciences, GE Healthcare). Os dados provenientes do seqüenciamento foram reunidos e analisados no programa ContigExpress (Invitrogen), e as *contigs* foram alinhadas no programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) com outras seqüências previamente depositadas no Genbank. Os vetores recombinantes foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para a construção, a fim de gerar dois fragmentos da clivagem entre o inserto e o vetor. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio.

4.7 Expressão da proteína recombinante InIA

Os plasmídeos recombinantes que continham a sequência correta foram utilizados para transformar por eletroporação células competentes de *E. coli* BL21(DE3) pLysS visando a expressão da proteína recombinante. Em um primeiro momento, foi realizada a expressão em pequena escala para verificação da expressão na cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformada com os clone pAE/*inIA*. Colônias de *E. coli* BL21(DE3) pLysS foram cultivadas em 5mL de LB líquido suplementado com 100µg.mL⁻¹ de ampicilina e 34µg.mL⁻¹ de cloranfenicol, *overnight*, a 37°C e sob agitação de 200 rpm.

Após, 1mL de cultivo foi utilizado como inóculo em 9mL de LB líquido, também suplementado com ampicilina e cloranfenicol, e incubado a 37°C sob agitação de 200rpm, até alcançar a fase log de crescimento em densidade ótica (DO₆₀₀) entre 0,5-0,7, onde o cultivo foi dividido em duas alíquotas. Uma foi suplementada com 1mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo), para induzir a expressão da proteína recombinante, e mantida por 3h nas mesmas condições iniciais, e a outra não foi induzida para posterior utilização como controle negativo.

Após 3h de indução, uma alíquota de 1mL foi coletada de cada amostra e centrifugada a 14.000rpm por 1min. O *pellet* formado durante a centrifugação foi ressuspenso em 1X tampão de carga contendo 2β-mercaptoetanol, fervido por 10min e, então, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12%. Após a constatação da expressão em pequena escala, as proteínas foram produzidas em maior escala (500mL) para realizar a purificação.

4.8 Purificação da proteína recombinante

A purificação da InIA recombinante (rInIA) foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna Hi-Trap (GE Healthcare) carregada com níquel (Ni⁺²-Sepharose, Invitrogen) conforme instruções do fabricante. Para a purificação foi utilizado o sistema de cromatografia líquida de baixa pressão ÄKTAPrime (GE Healthcare).

Inicialmente, as proteínas foram testadas quanto à solubilidade. Após centrifugação do cultivo induzido, o pellet foi ressuspenso em 30mL de tampão ÄKTA wash (50mM NaH₂PO₄; 300mM NaCl; 20mM Imidazole), suplementado com 200µL de lisosima e, após incubado em banho de gelo por 30min. Após este período as células foram sonicadas (6x, 15s, 20 kHz) e a solução foi centrifugada a 10.000g

por 30min a 4°C, e o sobrenadante separado e congelado. Visando a solubilização das proteínas insolúveis, o *pellet* foi tratado com 30mL de tampão ÄKTA wash contendo 0,2% de N-lauroylsarcosine (pH 8, suplementado com 0,05% de Tween 20) e deixado em agitação por 24h a 8°C, seguindo por mais uma centrifugação como anteriormente. O sobrenadante resultante foi separado, e ao *pellet* foi adicionado mais 30mL de tampão AKTA wash suplementado com 8M de uréia, seguindo o mesmo regime anterior.

Os três sobrenadantes obtidos (ÄKTA wash, ÄKTA wash com N-lauroylsarcosine e ÄKTA wash com uréia) foram filtrados em filtro 0,8µm (Millipore) e, em seguida, submetidos à purificação por cromatografia de afinidade. Ao final, alíquotas de 1mL contendo a proteína recombinante foram utilizadas para realização de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, após a qual, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R250. Ao final do teste foi constatado que rlnIA é solúvel em ÄKTA wash e esta estratégia foi adotada para obtenção de proteína purificada para ensaios posteriores.

4.9 Diálise, concentração e quantificação da proteína recombinante

Após a purificação, as frações eluídas contendo a proteína recombinante foram utilizadas para diálise rápida. As alíquotas foram depositadas em membranas de diálise e dializadas em tampão PBS 1X pH 7,5 a 4°C (1000x o volume) por aproximadamente 24h. Durante esse período foram realizadas 3 trocas de tampão total. Ao final, a proteína rlnIA foi concentrada em solução de polietilenoglicol a 20% (PM 20.000). As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método preconizado por Bradford (1976).

4.10 Análise das proteínas por Western blot

Western blot com a proteína rlnIA foi realizado conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, Hybond ECL (GE Healthcare), a qual em seguida foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado diluído em 1X PBS, pH 7,2 acrescido de 0,5% de Tween 20 (PBS-T) e incubado *overnight* a 4°C. Após, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T por 5min cada lavagem e, posteriormente, a membrana contendo a rlnIA foi incubada com anticorpo

monoclonal anti-cauda de histidina conjugado com peroxidase (Anti-His, Sigma). O anticorpo foi previamente diluído 1:10000 e incubado por 1h em temperatura ambiente. Finalmente, a reação na membrana foi revelada usando a solução cromógena de tetrahidrocloreto de diaminobenzedina (DAB, 0,6mg de 3.3 diaminobenzidina-tetrahidrocloreto; 10µL de H₂O₂ 30%; 9mL de Tris-HCl 50mM pH 7,6; 1 mL de Sulfato de Níquel 0,3%).

4.11 Produção de anticorpos monoclonais (MAbs)

4.11.1 Imunização dos camundongos

Para a produção dos MAbs, dois camundongos da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de vida, foram imunizados intraperitonealmente (i.p.) com 300µg de rInIA. Foram realizadas três inoculações de 100µg de rInIA no dia 1, 14 e 21, utilizando-se adjuvante de Freund completo (AFC) na primeira, e incompleto (AFI) nas duas doses subseqüentes. Uma semana após a última imunização (no dia 28), e quatro dias antes da realização da fusão celular, retirou-se sangue dos camundongos por punção do plexo retro-ocular, o soro separado por centrifugação e os títulos de anticorpos determinados por ELISA indireto (*Enzyme-Linked Immunossorbent Assay*).

Para o ELISA, 100µL da rInIA (6µg.mL⁻¹) diluída em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, pH 9,6) foram adicionados em placa de poliestireno de 96 cavidades (Polysorp, Nunc) que foi incubada a 37°C por 1h, posteriormente a placa foi lavada 3 vezes com 200µL de PBS-T por cavidade. Os soros dos camundongos diluídos 1:100 até 1:3200 foram adicionados (100µL/cavidade) e incubados por 1h a 37°C. Após lavar por 3 vezes com PBS-T, foi adicionado um conjugado de anticorpos de cabra anti-camundongo com peroxidase diluído 1:2000 e a placa foi novamente incubada como acima. Após, a placa foi lavada 5 vezes com PBS-T para se retirar o excesso de conjugado e foi adicionado 100µL da solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD) diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,0 (0,2M com 0,01% de H₂O₂). A placa foi mantida por 15min no escuro a temperatura ambiente e a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro para microplacas (Titertek Multiskan MCC/340) com filtro de 450nm. Como controle negativo foi utilizado soro de camundongo não imunizado.

O camundongo que apresentou maior título de anticorpos anti-rInIA foi selecionado para fusão e recebeu uma dose de reforço de 100µg da proteína com adjuvante incompleto por via i.p. e uma dose com a proteína rInIA pura ($\pm$ 50µg) por via endovenosa, totalizando aproximadamente 450µg.

4.11.2 Fusão celular

A produção dos anticorpos monoclonais foi realizada segundo as recomendações de Harlow e Lane (1988). O camundongo que apresentou maior título de anticorpos anti-rInIA foi eutanasiado por deslocamento cervical e o baço removido em ambiente estéril. O baço foi macerado em meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma) incompleto (MI), centrifugado e as células ressuspensas em MI, sendo novamente centrifugadas. Ao final de três repetições deste processo, as células foram ressuspensas em 10mL de MI.

As células do baço do camundongo imunizado com o antígeno rInIA foram misturadas com células de mieloma da linhagem SP2/O cultivadas em meio DMEM completo (MC). A mistura foi centrifugada, o sobrenadante desprezado, e as células induzidas à fusão com solução de polietilenoglicol (PEG) a 50% (PM 3.000). Essa suspensão foi agitada por 1min e, após, adicionados 9mL de MI, por 5min. A solução foi novamente centrifugada e as células ressuspensas em 80mL de MC contendo meio HAT (hipoxantina [1×10^{-6} M]; aminopterina, [4×10^{-9} M]; timidina, [$1,6 \times 10^{-7}$ M]) e, logo após, distribuídas (200µL/cavidade) em 5 placas de cultivo de células de 96 cavidades cada. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e o meio contido em cada cavidade trocado em intervalos de três dias ou quando necessário.

4.11.3 Seleção das cavidades positivas, cultivos e estocagem

Após 14 a 21 dias de cultivo foi realizado um ELISA indireto com rInIA ($6\mu\text{g.mL}^{-1}$) para verificar a produção de anticorpos nas cavidades que apresentaram crescimento de hibridomas. Os cultivos de hibridomas que reagiram com a proteína recombinante foram clonados duas vezes pela técnica da diluição limitante (CAMPBELL, 1991), retestados, expandidos e congelados em nitrogênio líquido e/ou injetados em camundongos para produção de ascite.

4.11.4 Produção de ascite

Com objetivo de obter maiores quantidades de MAbs, os hibridomas foram crescidos em tumores ascíticos. Para tal, camundongos BALB/c com 6-8 semanas de vida foram previamente tratados i.p. com 0,5mL de óleo mineral (Bayer). Após 10 dias, 0,5mL de células suspensas MI contendo 5×10^6 de células hibridomas foram inoculadas i.p. nos camundongos. Entre o 10°-12° dia após a inoculação os camundongos foram puncionados para a retirada do fluido ascítico, que, em seguida, foi centrifugado por 5min a 1500g, e o sobrenadante estocado a -20°C até sua purificação.

4.11.5 Isotipagem dos MAbs

A Isotipagem dos MAbs foi realizada através do kit de Isotipagem (Sigma) seguindo instruções do fabricante. Uma placa de poliestireno de 96 cavidades foi sensibilizada com 50µL de rInIA ($6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), e mantida à 37°C por 1h. Após a lavagem de cada cavidade por 3 vezes com 200µL de PBS-T, adicionou-se 50µL do meio de cultivo de cada hibridoma, e incubou-se novamente à 37°C por 1h e, em seguida, a placa foi lavada novamente 3 vezes com 200µL de PBS-T. Após, 50µL de anticorpos de cabra anti-isotipo específicos (Sigma) foram diluídos em PBS-T na proporção de 1:4000 e adicionados às cavidades. A placa foi incubada a 37°C por 1h, lavada 3 vezes com PBS-T, e, após, foi adicionado 50µL de conjugado de anticorpos de coelho anti-IgG de cabra com peroxidase, diluído na proporção 1:4000 em PBS-T, e a placa foi novamente incubada a 37°C por mais 1h. Após, foi realizada nova lavagem da mesma forma já descrita, e adicionado 50µL de cromógeno ortofenilenodiamina (OPD). A leitura foi realizada após 15min de reação no escuro em espectrofotômetro com filtro de 450nm.

4.11.6 Purificação e quantificação dos MAbs

Os sobrenadantes dos fluidos ascíticos foram filtrados em filtro de 0,8µm e purificados em coluna de proteína G-Sepharose de acordo com as instruções do fabricante (Amersham, MS). Alíquotas de 1mL foram coletadas em Tris-HCl pH 9; dializadas contra PBS (500 x o volume total das frações) a 4°C por 24h. Após a diálise, os MAbs foram concentrados em solução de polietilenoglicol a 20% (PM

20.000) e a concentração (mg.mL^{-1}) dos anticorpos foi determinada em espectrofotometria por UV utilizando comprimento de onda de 280nm. O cálculo foi realizado através do coeficiente de extinção da IgG (1,35). Após purificação, os MAbs foram titulados através de ELISA indireto com a proteína rInIA ajustada para $6\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os anticorpos foram armazenados a -20°C para futuras utilizações.

4.11.7 Constante de Afinidade (Ka)

A determinação da Ka dos MAbs foi realizada de acordo com protocolo estabelecido por Friguet et al., (1985) com algumas modificações. Antes de iniciar, a concentração adequada de cada MAb a ser utilizado na determinação da Ka foi selecionada por ELISA indireto. Para tal, a proteína rInIA foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato à concentração de $3\mu\text{g.mL}^{-1}$, adicionado em placa de poliestireno de 96 cavidades ($100\mu\text{L}/\text{cavidade}$) e incubada a 20°C por 24h. Após, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T ($200\mu\text{L}/\text{cavidade}$) e $100\mu\text{L}$ dos MAbs diluídos em PBS-T (10 diluições decimais variando entre 0,1 e $1 \times 10^{-4} \text{mg.mL}^{-1}$) foram adicionados em cada cavidade. A seguir adicionou-se conjugado cabra anti-camundongo com peroxidase ($100\mu\text{L}/\text{cavidade}$) na diluição 1:4000 e, após incubação por 1h e lavagem, foi adicionado $100\mu\text{L}$ de solução cromógena de OPD diluído em tampão citrato-fosfato pH 4,0. A leitura foi realizada após 15min em espectrofotômetro a 450nm, depois de serem mantidas no escuro e em temperatura ambiente.

Depois de selecionada a concentração de MAb a ser usado determinou-se a Ka conforme descrito a seguir. Uma placa foi sensibilizada com $3\mu\text{g.mL}^{-1}$ de rInIA conforme descrito anteriormente. Seis diluições da rInIA, com concentrações entre 4×10^{-10} a $2 \times 10^{-7} \text{M}$ foram preparadas em microtubos e incubadas com cada MAb por 15h a 20°C para que a reação atingisse o equilíbrio. Como controle utilizou-se MAb sem reagir com rInIA. Após esse período, o conteúdo dos tubos foi adicionado à placa ($100\mu\text{L}$ por cavidade) para observar a reação dos MAbs livres ao antígeno presente na placa. A seguir foi adicionado conjugado de cabra anti-camundongo com peroxidase ($100\mu\text{L}/\text{cavidade}$) na diluição 1:4000 e, após incubação e lavagem, adicionou-se $100\mu\text{L}$ de solução cromógena OPD. Após 15 minutos a leitura da reação foi realizada em espectrofotômetro a 450nm. As absorbâncias do ELISA realizado após o complexo antígeno anticorpo (Ag-MAb) ter atingido o equilíbrio

foram utilizadas na equação $(A_0 - A_i)/A_i = K_a \cdot I_i$, conforme sugerido por Bobrovnik (2003), para obter as retas para determinação da K_a . Nesta equação A_0 é a absorbância obtida com o MAb na concentração selecionada, sem haver reagido com Ag no microtubo; A_i é a absorbância obtida na reação feita após o complexo Ag-MAb ter atingido o equilíbrio; K_a é a constante de afinidade; e I_i é a concentração de Ag utilizada. Um histograma foi construído utilizando esta equação e K_a foi determinada pela equação da reta obtida, onde a inclinação da reta é K_a .

4.11.8 ELISA com a proteína nativa

Foram utilizados diferentes meios de cultivo para o crescimento de *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri* (caldos LEB, TSB-YE e LB) com o objetivo de avaliar as condições de crescimento mais adequadas para este experimento. Outras bactérias não *Listeria* (tab. 1) foram cultivadas exclusivamente em caldo TSB-YE e LB.

As bactérias foram cultivadas em 10mL por 18h a 37°C, e após lavagem com PBS 1X estéril por 3 vezes, as células foram ressuspensas em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 e, em seguida ajustadas para $DO_{600}=1,5$. Para sensibilização da placa, 100µL da suspensão foram adicionados por cavidade, e após incubado *overnight* a 4°C. Passado este período a placa foi lavada por 3 vezes com 200µL de PBS-T por cavidade.

Os MAbs (concentração inicial de 1mg.mL^{-1}) foram diluídos 1:100 e adicionado 100µL as cavidades, e assim incubado por 1h a 37°C. Após 3 novas séries de lavagens, o conjugado cabra anti-camundongo com peroxidase diluído 1:2000 foi adicionado e incubado por mais 1h a 37°C. O excesso de conjugado foi retirado após 5 lavagens com PBS-T e a solução cromógena OPD foi adicionada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm após 15min de reação no escuro. Todos os anticorpos foram testados em duplicata.

Para o controle das reações de ELISA, dois anticorpos policlonais foram previamente preparados, um para a proteína InIA e, outro para *L. monocytogenes*. O primeiro controle consistia de uma ascite policlonal anti-rInIA previamente preparada a partir de algumas modificações do método originalmente descrito por Cevenini et al. (1991). O soro policlonal anti-*L. monocytogenes* foi preparado inoculando, i.p, *L.*

monocytogenes inativadas por fervura por 20min em camundongos. O controle negativo foi realizado utilizando-se soro normal de camundongo.

4.11.9 Dot blot com a proteína recombinante

A reatividade dos MABs com a proteína recombinante foi avaliada também por *Dot blot*. A proteína foi aplicada diretamente em membrana de nitrocelulose utilizando-se 10µL da rInIA (6µg.mL⁻¹), deixado secar em temperatura ambiente por 10min e, em seguida, bloqueado com 5% de leite em pó em PBS por 1h. Após, as membranas foram lavadas com PBS-T por 3 vezes e, então, os MABs foram adicionados na concentração de 1:500, incubadas por 1h e lavadas por mais 3 vezes. Após, adicionar-se o conjugado cabra anti-camundongo com peroxidase (1:2000) por 1h. A reação foi revelada utilizando-se o cromógeno DAB. Todas as reações foram realizadas em temperatura ambiente. Como controle negativo foi usado soro de camundongo não imunizado.

4.11.10 Western blot com a proteína nativa

Para os testes com a proteína nativa, células de *Listeria* foram cultivadas em 20mL de caldo LEB e outras bactérias não *Listeria* foram cultivadas em 20mL de caldo TSB-YE. As células foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com PBS e o *pellet* foi ressuspensionado em 1mL de PBS, sonificadas por 3 vezes durante 30s e, após, acrescido de 20% de tampão de amostra onde foram fervidas por 20min. As amostras foram aplicadas em SDS-PAGE a 10% para a separação eletroforética. Em seguida, as proteínas foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) por 2h com a fonte ajustada para diferença de potencial elétrico (DDP) 100V. As membranas foram bloqueadas *overnight* com 5% de leite em pó desnatado em PBS-T. Os MABs anti-rInIA foram diluídos (1:500) em PBS-T e adicionados à membrana durante 1h, após lavar foi adicionado o conjugado cabra anti-camundongo com peroxidase diluído 1:2000 em PBS-T e a membrana foi incubada por mais 1h. Todas as reações com anticorpos foram realizadas em temperatura ambiente e a membrana foi submetida a três lavagens durante 5min com PBS-T entre cada etapa. A revelação foi realizada com a solução cromógena DAB.

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação por PCR da região do gene *inIA* de *L. monocytogenes*

Uma região do gene *inIA* foi amplificada por PCR empregando os *primers* descritos na Tab. 2. Tais oligonucleotídeos foram desenhados de forma a amplificar apenas um segmento que codifica um peptídeo hidrofílico, correspondente a um fragmento de 906 pb (Fig. 5). Como controle interno da amplificação (IAC) foram utilizados os *primers* universais fD1 e rP2 (WEISBURG et al., 1991) para amplificar um segmento de 1500 pb do gene rRNA 16s.

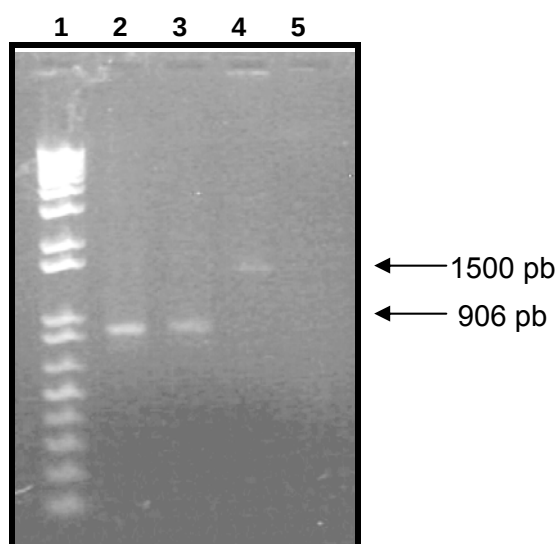


Figura 5. Amplificação de segmento do gene *inIA* por PCR. Gel de agarose 1%. 1- Marcador de massa molecular 1kb DNA Plus Ladder; 2 e 3- Fragmento de *inIA*; 4- Fragmento de rRNA 16s (IAC); 5- Controle negativo.

5.2 Produção da proteína recombinante InIA

O fragmento do gene *inIA* e o vetor pAE foram inicialmente purificados e então preparados para clonagem utilizando as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*II. Ao final das etapas de digestão o vetor pAE foi defosforilado, e ambas as moléculas foram novamente purificadas. Após a quantificação por eletroforese em gel de agarose (Fig. 6), as duas moléculas foram utilizadas na construção do plasmídeo recombinante.

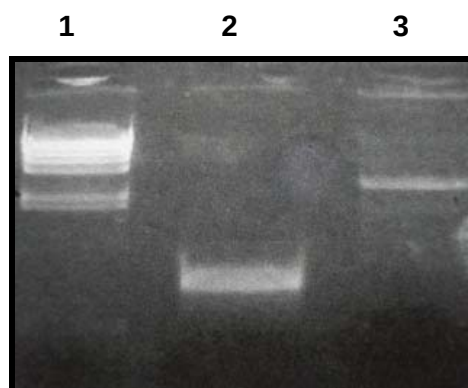


Figura 6. Quantificação do gene *inlA* e pAE. Gel de agarose 0,8%. 1- Marcador de massa molecular Lambda *Hind*III; 2- Fragmento *inlA*; 3- pAE

O produto da ligação foi usado para transformar células de *E.coli* Top10F' eletrocompetentes que, depois de cultivadas em placas, foram selecionadas pelo método de lise rápida “microprep” (JOUGLARD et al., 2005). Onze clones contendo o plasmídeo recombinante foram cultivados em meio líquido, e o DNA plasmidial foi extraído para confirmação em gel de agarose a 0,8% (Fig. 7).

Dois clones foram utilizados para confirmar a presença do gene alvo através da digestão com as mesmas enzimas de restrição empregadas na preparação para clonagem. Na eletroforese foram visualizadas uma banda de 906 pb, referente ao fragmento amplificado a partir do gene *inlA*, e outra banda de 2831pb correspondente ao vetor pAE (Fig. 8). O seqüenciamento de um dos clones recombinantes possibilitou confirmar a presença de parte da seqüência do gene *inlA* e demonstrou 99% de similaridade com as seqüências do gene *inlA* de *L. monocytogenes* depositadas no GenBank. O mapa do vetor construído pode ser visualizado na Fig. 9.

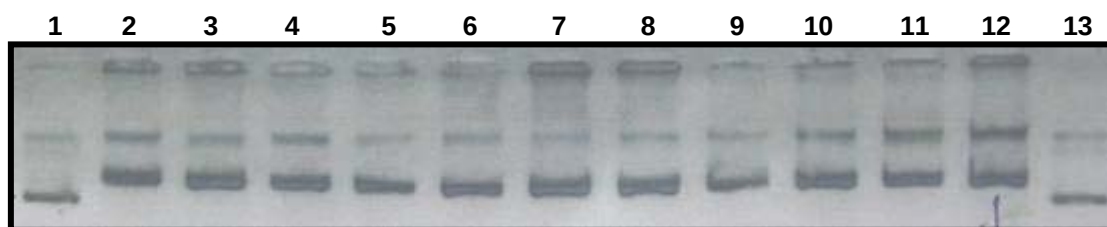


Figura 7. Triagem de clones recombinantes em gel de agarose 0,8%. 1 e 13: pAE; 2 a 12: clones pAE/*inlA* recombinantes.

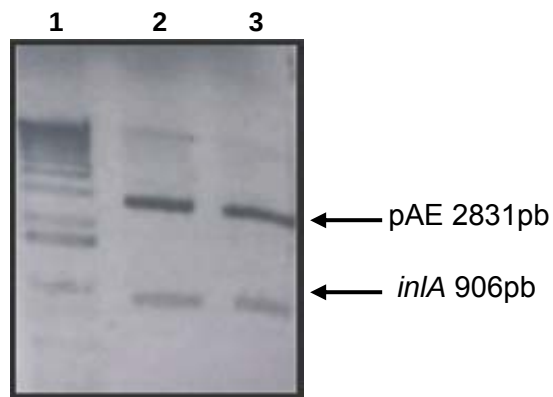


Figura 8. Digestão de clones recombinantes com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I. Gel de agarose 0,8%. 1- Marcador 1 Kb DNA Plus Ladder; 2 e 3- Clones 3 e 4.

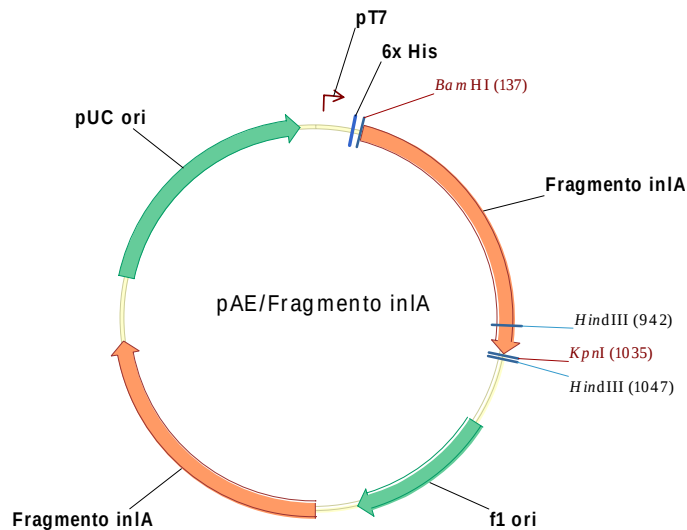


Figura 9. Mapa do vetor pAE/*inIA*

Quatro vetores recombinantes foram introduzidos por eletroporação em células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS competentes a fim de avaliar a expressão da proteína rInIA. Inicialmente, foi realizado um teste da capacidade de expressão de rInIA em pequena escala que confirmou a produção de um fragmento com uma massa aparente de 33kDa (Fig. 10).

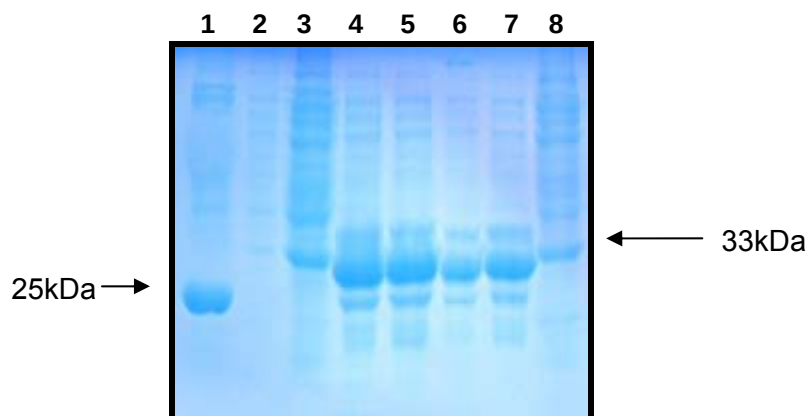


Figura 10. Expressão em pequena escala de internalina recombinante. SDS-PAGE 12%; 1- Marcador 25kDa; 2- Extrato de *E. coli* BL21(DE3) pLysS sem indução; 3 e 8 - Extrato de *E. coli* BL21(DE3) pLysS induzido; 4-7 - Clones 3 a 6 induzidos.

Após a confirmação da expressão da *rlnIA*, os plasmídeos recombinantes referentes aos clones 3 e 4 foram selecionados aleatoriamente e novamente introduzidos em *E. coli* BL21(DE3) pLysS eletrocompetentes para produção da proteína em maior escala. Os cultivos foram realizados em um volume final de 500mL de meio LB líquido com ampicilina. O clone 4 foi cultivado em dois volumes de 500mL (*pellet* 1 e 2) e o clone 3, em um volume de 500mL. Na Fig. 11 é demonstrado o resultado da expressão em larga escala de *rlnIA* pelos clones 3 e 4.

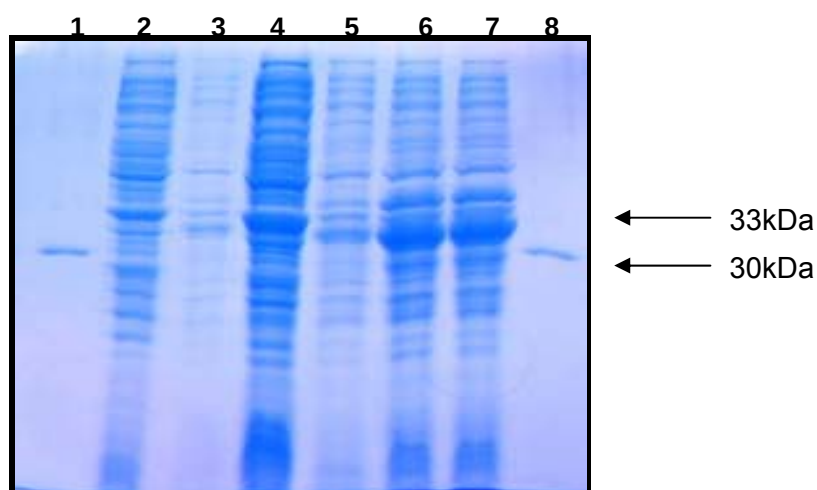


Figura 11. Expressão em larga escala de internalina recombinante (*rlnIA*) visualizada em SDS-PAGE 12%. 1 e 8- Marcador de 30kDa; 2- Extrato de *E. coli* BL21(DE3) pLysS sem indução; 3- Clone 3 não induzido; 4- Clone 3 induzido; 5- Clone 4 não induzido; 6- Clone 4 induzido (*pellet* 1); 7- Clone 4 induzido (*pellet* 2).

5.3 Purificação e quantificação da proteína rInIA

Os ensaios de solubilidade revelaram que a rInIA é solúvel em ÄKTA wash. Com isso, a proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade pelo sistema ÄKTAprime empregando tampões contendo unicamente ÄKTA wash e dializado com PBS 1X. A proteína foi eluída em frações de 1mL as quais foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (Fig. 12). A presença da proteína recombinante entre as amostras purificadas foi confirmada através de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal anti-His conjugado com peroxidase (Fig. 13). Após, as preparações purificadas foram dializadas e em seguida a proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976).

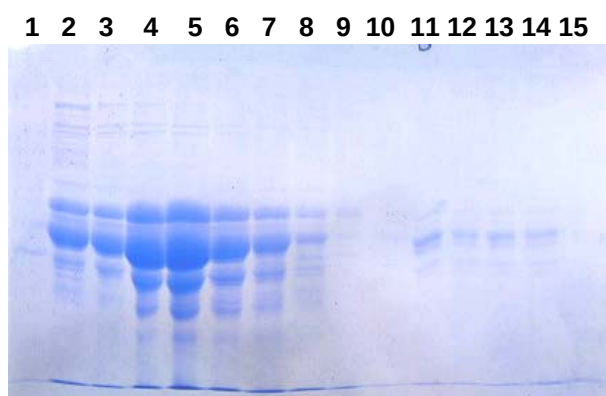


Figura 12. SDS-PAGE das amostras purificadas sem e com N-lauroylsarcosine. 1- Marcador de 30kDa; 2 a 8- rInIA, em ÄKTA wash (solúvel); 10 a 15- rInIA, ÄKTA wash com N-lauroylsarcosine (insolúvel).

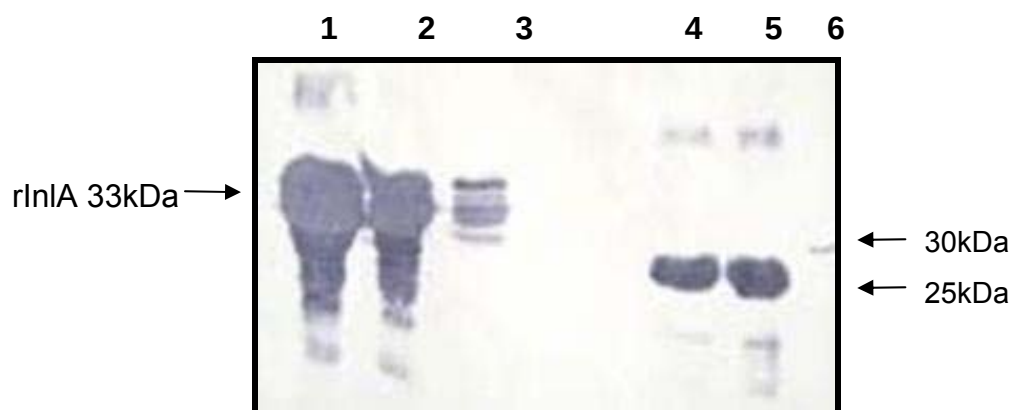


Figura 13. *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-His para confirmação da purificação da proteína rInIA. 1 a 3- rInIA; 4 e 5- Proteína recombinante de 25kDa; 6- Proteína recombinante de 30kDa.

5.4 Produção e caracterização dos anticorpos monoclonais (MAbs)

5.4.1 Produção e purificação dos MAbs

As células do baço do camundongo imunizado com rInIA e as células de mieloma da linhagem Sp2/0 foram hibridizadas com sucesso. Os cultivos de hibridomas que apresentaram atividade de anticorpos em ELISA indireto contra rInIA foram clonados duas vezes, expandidos e retestados. Ao final desse processo foram obtidos cinco hibridomas secretores de MAbs anti-rInIA nomeados de 1H2, 3C5, 3C6, 3A12 e 5H6.

Após produção de ascite, os MAbs foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína G-Sepharose, concentrados em PEG, e sua pureza foi confirmada por eletroforese em SDS-PAGE 12% (Fig. 14).



Figura 14. SDS-PAGE 12% do MAb purificado. 1- Marcador de 30kDa; 2- MAb 3A12

5.4.2 Isotipagem dos MAbs

A isotipagem dos cinco MAbs, realizada utilizando o sobrenadante do meio de cultivo dos hibridomas e um kit de isotipagem (Sigma), revelou que todos são do isotipo IgG1.

5.4.3 Titulação dos MAbs purificados em ELISA indireto

Para determinar a curva de titulação dos MAbs purificados foi realizado um ELISA indireto. As preparações de MAbs foram ajustadas para a concentração de $1,5\text{mg.mL}^{-1}$, diluídas em base 2 e testadas em duplicata no ELISA.

A Fig. 15 demonstra as curvas de titulação da reação de cada um dos MAb's contra a rInIA ($6\mu\text{g.mL}^{-1}$). Apesar do MAb 5H6 ter obtido uma maior titulação, ressalta-se que o mesmo foi utilizado a partir de fluido ascítico e não purificado como os outros MAb's. Desta forma, avaliando somente os MAb's purificados e ajustados, pode-se considerar que o MAb 3C5 foi o que obteve melhores resultados, e o MAb 3C6 apresentou a menor titulação.

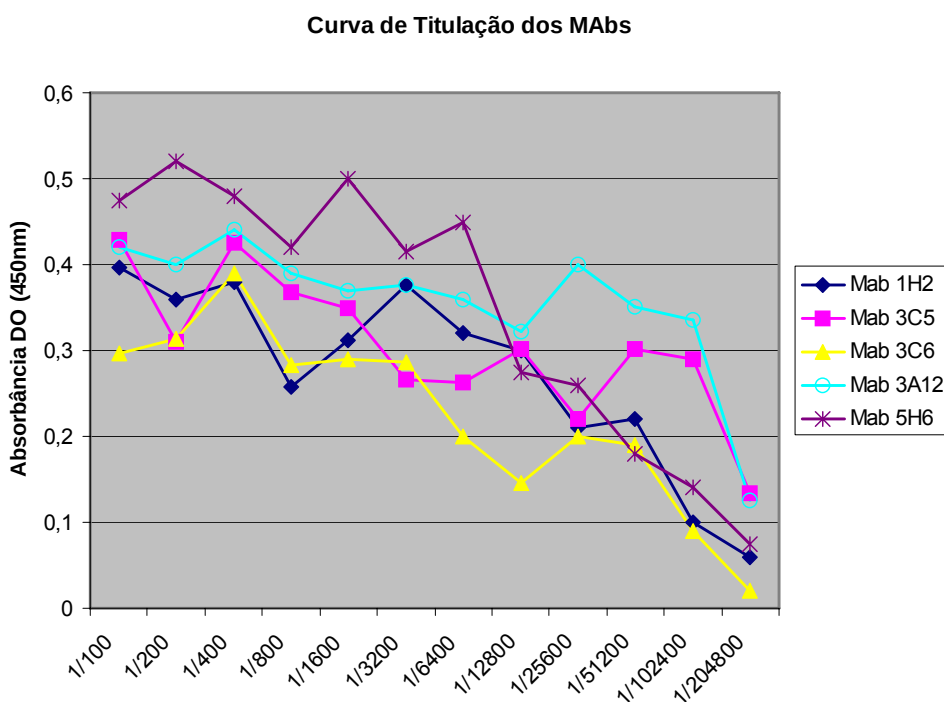


Figura 15. Curvas de titulação dos MAb's com a proteína rInIA ($6\mu\text{g.mL}^{-1}$) por ELISA indireto.

5.4.4 Constante de afinidade

Na tab. 3 são demonstrados os resultados obtidos com a constante de afinidade dos cinco MAb's. O MAb 3C5 apresentou melhor resultado, com uma afinidade pelo antígeno rInIA de $K_a = 7 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}$, enquanto o MAb 5H6 obteve o pior desempenho ($K_a = 4 \times 10^6 \text{ L.mol}^{-1}$).

Tabela 3. Constante de afinidade (K_a) dos anticorpos monoclonais anti-rInIA .

Anticorpos Monoclonais					
	1H2	3C5	3C6	3A12	5H6
$K_a (\text{L.mol}^{-1})$	2×10^7	7×10^7	7×10^6	4×10^7	4×10^6

5.4.5 ELISA indireto com proteína nativa

L. monocytogenes foi cultivada em diferentes caldos de enriquecimento para avaliar a reatividade dos MAb's com a rInIA nativa em ELISA indireto. Inicialmente, foram utilizadas as cepas de *L. monocytogenes* 4b (Lm10/Clínica) e *L. innocua* 6a vivas e também mortas por fervura após cultivo em caldo LEB. Neste experimento, todos os MAb's reagiram somente com *L. monocytogenes* (viva), com os resultados de absorbância variando entre 0,410 (MAb 3C5) e 0,125 (MAb 1H2). Quando as células de *L. monocytogenes* foram inativadas por fervura (100°C por 20min) a reatividade de todos MAb's diminuiu expressivamente (Fig. 16). Não houve reação dos MAb's com *L. innocua* tanto viva quanto morta por fervura. As absorbâncias observadas com *L. innocua* viva ficaram entre 0,04 e 0,004, para os MAb's 3A12 e 3C6, respectivamente (Fig. 17). A absorbância dos controles negativos com as células vivas foi de 0,03, e com as células mortas, de 0,01, tanto para *L. monocytogenes* como para *L. innocua*.

Em um segundo experimento, similar ao anterior, porém utilizando outra cepa de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b (Lm01/Alimento, tab. 1) e *L. innocua* 6a, evidenciou-se melhor a reação específica dos MAb's com *L. monocytogenes* (Fig. 18). Neste experimento não foram usados os MAb's 3C6 e 1H2, e o controle negativo apresentou absorbância de 0,01.

Como pode ser visualizado nas figuras 16, 17 e 18, a ascite policlonal anti-rInIA apresentou alta absorbância com *L. monocytogenes*, e menor reação com *L. innocua*. O mesmo foi observado com a utilização do soro policlonal anti-*L. monocytogenes*, que obteve uma maior densidade ótica com *L. monocytogenes*. O soro poli anti-*L. monocytogenes* quando testado contra a proteína rInIA em ELISA indireto demonstrou positividade, desta forma evidenciando que há produção de anticorpos contra a proteína recombinante também, a partir da proteína nativa (dados não mostrados).

Numa segunda etapa, foram avaliadas as reações dos MAb's com as bactérias cultivadas em meio não seletivo. Para isto, todas as bactérias listadas na tab. 1, foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) e TSB-YE. Os MAb's não reconheceram as cepas de *L. monocytogenes* quando foi utilizado o meio LB para o crescimento das bactérias. As reações controle com ascite policlonal anti-rInIA também foram fracas (média de 0,130), porém, as reações com o soro policlonal

anti-Lm foram fortes ($DO \geq 0,650$), demonstrando desta forma a presença de células bacterianas na placa. Nenhuma das outras bactérias não *Listeria* reagiram com os MAb's (dados não mostrados).

A reação dos MAb's com *L. monocytogenes* cultivadas em TSB-YE foram inconsistentes e não renderam resultados conclusivos.

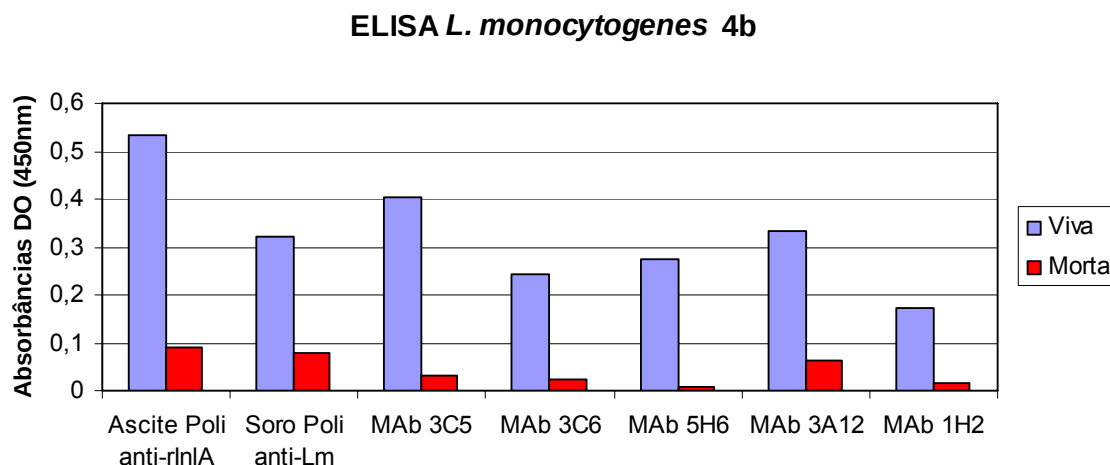


Figura 16. Reatividade dos MAb's com *L. monocytogenes* 4b (clínica) cultivadas em LEB com células vivas e mortas por ELISA indireto. As reações dos controles negativos para células vivas e mortas foram 0,03 e 0,01, respectivamente.

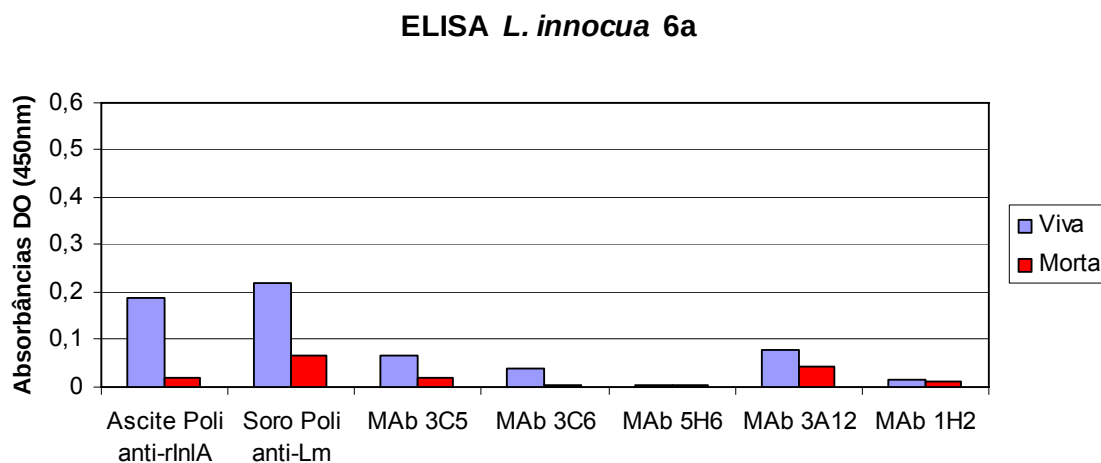


Figura 17. Reatividade dos MAb's com *L. innocua* 6a cultivadas em LEB com células vivas e mortas por ELISA indireto. As reações dos controles negativos para células vivas e mortas foram 0,03 e 0,01, respectivamente.

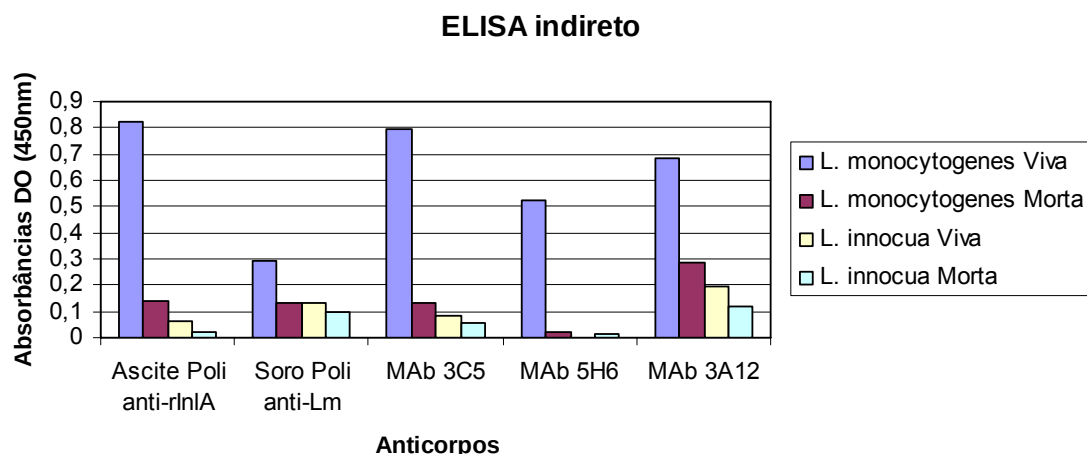


Figura 18. Reatividade por ELISA indireto dos MABs 3C5, 5H6 e 3A12. *L. monocytogenes* 4b e *L. innocua* 6a cultivadas em LEB com células vivas e mortas. Absorbância do controle negativo para células vivas e mortas foi 0,01.

5.4.6 Dot blot com a proteína rInIA

Observando-se as reações de cada MAb com a proteína recombinante, pela técnica de *Dot blot*, percebe-se que o MAb 1H2 foi o que apresentou menor reação, e que o MAb 3C6 apresentou reação com intensidade melhor (Fig. 19).

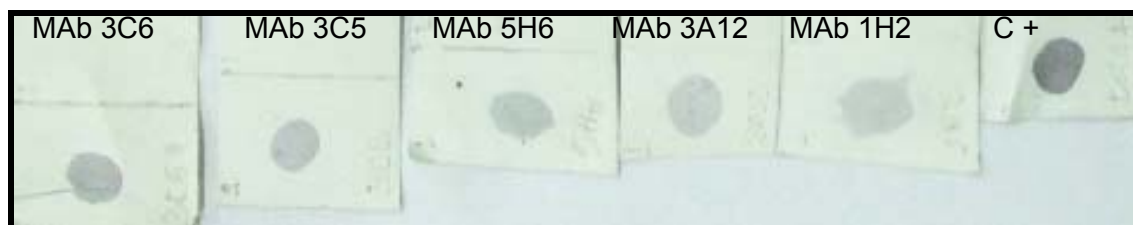


Figura 19. *Dot blot* dos cinco MABs com rInIA. C+, ascite policlonal anti-rInIA usado como controle positivo.

5.4.7 Western blot com as proteínas recombinante e nativa

Western blot foi realizado com o objetivo de confirmar os resultados do ELISA indireto, bem como identificar a massa molecular da proteína que os MABs reconheciam, verificando se era a massa esperada para InIA em sua forma nativa. Outra observação que pôde ser obtida a partir do *Western blot* foi se os MABs tinham capacidade de reconhecer as proteínas em uma forma linear, já que o tratamento com agente desnaturante (SDS) faz com que as proteínas fiquem linearizadas.

A proteína rInIA foi ajustada para se obter aproximadamente 2µg/cavidade para testar cada um dos MAb. O MAb 3C5 demonstrou melhor reatividade com a proteína recombinante, evidenciando um padrão de banda mais forte do que os outros MAb (Fig. 21, coluna 8). O MAb 1H2 demonstrou baixa reatividade com a proteína rInIA, em contraste com os resultados obtidos com os outros MAb onde pode-se observar melhores reações com a proteína recombinante (dados não mostrados).

Para avaliar a reação com as proteínas nativas das bactérias, foram preparados os extratos protéicos de *L. monocytogenes* (sorotipos 4b, 4d, 1/2a e 1c), *L. innocua* 6a, *L. seeligeri*, *S. enterica*, e *B. cereus*. Como se pode observar na Fig. 20, as reações utilizando-se o MAb 3C5 evidenciaram banda de reconhecimento da proteína rInIA (coluna 1) e com os extratos protéicos de *L. monocytogenes* de todos os sorotipos testados (colunas 2 a 5), as quais localizavam-se na altura da massa molecular esperada para a InIA nativa (aproximadamente 88kDa). Não se visualizou reação com *L. innocua* 6a (coluna 6) e *S. enterica* (coluna 7). O mesmo MAb foi testado com extrato protéico de *L. seeligeri*, *B. cereus* e *S. epidermidis*, e também demonstrou não reconhecer proteína dessas bactérias (dados não mostrados).

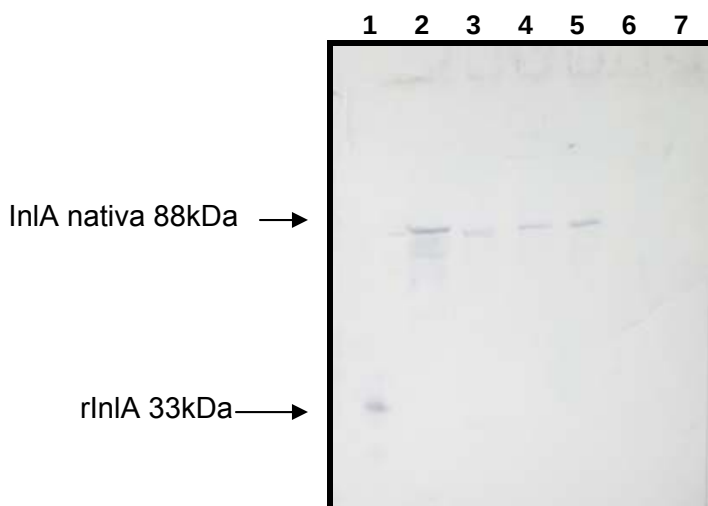


Figura 20. Western blot com proteína recombinante e nativa utilizando MAb 3C5. 1- Proteína rInIA; 2- *L. monocytogenes* 4b (clínica); 3- *L. monocytogenes* 4d; 4- *L. monocytogenes* 1/2b; 5- *L. monocytogenes* 1b; 6- *L. innocua* 6a; 7- *S. enterica*

Os outros MAb, quando avaliados por *Western blot* com as mesmas bactérias e cepas, apresentaram resultados similares ao MAb 3C5, a não ser o MAb 1H2 que pareceu não reagir com a proteína nativa na forma linear (Fig. 21, coluna 4).

A Figura 21 demonstra as reatividades dos MAb 1H2 e 3C5 com outra cepa do sorotipo 4b (Lm01/Alimento). Nota-se que o MAb 1H2 não reconheceu a proteína na sua forma nativa (coluna 4), e reagiu fracamente com a proteína recombinante (coluna 5).

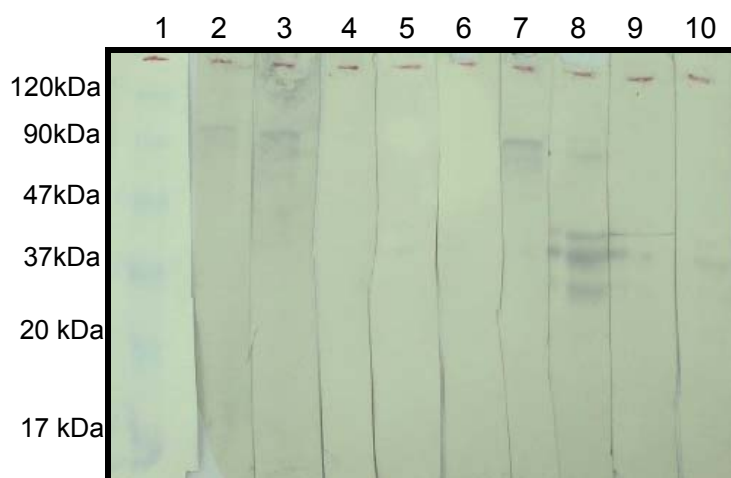


Figura 21. *Western blot* com os MAb 1H2 e 3C5. 1- Marcador de massa molecular pré-corado; 2- *L. monocytogenes* 4b com ascite policlonal anti-rlnIA; 3- *L. monocytogenes* 4b com soro policlonal anti-*L.monocytoges*; 4- *L. monocytogenes* 4b com MAb 1H2; 5- Proteína rlnIA com MAb 1H2 ; 6- *L.innocua* com MAb 3C5; 7- *L. monocytogenes* 4b com MAb 3C5; 8- Proteína rlnIA com MAb 3C5; 9 – *L. seeligeri* com MAb 3C5; 10 - Proteína rlnIA com MAb 3A12

6 DISCUSSÃO

A detecção de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos é uma importante preocupação para a indústria de alimentos e para as agências reguladoras. O número de relatos de surtos por *L. monocytogenes*, assim como o aumento de *recalls* de produtos relacionados a contaminação por esse microrganismo, evidencia a grande necessidade de se desenvolver e padronizar métodos rápidos que sejam universalmente aceitos como métodos de rotina para detecção desse patógeno alimentar.

A legislação de muitos países não permite a presença de *L. monocytogenes* (“tolerância zero”) em vários tipos de alimentos (WHO/FAO, 2005). No Brasil, infelizmente, a legislação vigente só preconiza a avaliação desse patógeno em queijo Minas Frescal, no qual é necessária a ausência em 25g. Mesmo assim, muitas empresas brasileiras utilizam como rotina a detecção desse microrganismo em diversos alimentos, seja para controle interno de qualidade e segurança da própria empresa, seja para cumprir exigências de empresas importadoras e/ou agências de países aos quais seus produtos serão exportados.

O principal foco deste trabalho foi produzir anticorpos monoclonais que possam ser empregados no diagnóstico rápido de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos. A estratégia adotada para atingir esse objetivo envolveu a clonagem e expressão de um fragmento do gene alvo *inlA*, o qual foi clonado no sistema de expressão de proteínas heterólogas *E. coli*, possibilitando a expressão da rInlA utilizada como imunógeno para imunização dos camundongos.

Inicialmente, ao se desenhar os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação do fragmento do gene *inlA*, teve-se o cuidado de se evitar regiões hidrofóbicas, por que estas regiões poderiam dificultar o processo de purificação e manutenção das proteínas na forma solúvel. Isso não foi uma tarefa difícil, pois a proteína InlA em sua forma nativa na bactéria está amplamente exposta na superfície celular, sendo assim, altamente hidrofílica (SCHUBERT et al., 2002).

O vetor pAE, utilizado na clonagem e expressão da proteína rInlA, se mostrou altamente eficaz. Outros estudos utilizando este mesmo vetor de expressão, também obtiveram resultados satisfatórios (SIMIONATTO et al. 2005, MOREIRA et al., 2007; VIEIRA et al., 2007). Esse vetor possui um operador *lac* e o promotor do

fago T7, que são reconhecidos pela RNA polimerase de *E. coli*. Possui, também, origem de replicação em *E. coli*, um sítio de múltipla clonagem, e um gene de resistência ao antibiótico ampicilina. Além disso, permite a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de seis resíduos de histidina em sua porção N-terminal (His-Tag), o que possibilita a posterior purificação dessas proteínas por cromatografia de afinidade (ROSENBERG et al., 1987).

A *E. coli* BL21(DE3) pLysS também demonstrou-se adequada para ser utilizada para a expressão da rlnIA, obtendo quantidade satisfatória de proteína. Esse resultado é interessante, haja vista que não foi necessário à utilização de outra estirpe de *E. coli* para esta finalidade, corroborando com outros trabalhos que avaliaram a melhor cepa de expressão para proteínas de interesse, e verificaram que a cepa *E. coli* BL21(DE3) pLysS apresentou os maiores níveis de expressão (SIMIONATTO et al., 2005; LUERCE; SIMIONATTO; DELLAGOSTIN, 2006). As cepas de *E. coli* BL21(DE3) pLysS são capazes de expressar a RNA polimerase do fago T7 após indução com IPTG ou lactose, controlando dessa forma, o momento adequado para expressão da proteína heteróloga. O uso de *E. coli* como sistema de expressão de proteína recombinante apresenta importantes vantagens em relação a outros sistemas, pela facilidade e baixo custo de cultivo desta bactéria e pela grande quantidade de proteína recombinante que pode vir a ser produzida (ZHU; ZHAO; SOMERVILLE, 1997).

Os testes de solubilidade com a proteína rlnIA demonstraram que ela é solúvel, o que facilitou a purificação e a recuperação da proteína. Além disso, a proteína se apresentando na forma solúvel favorece que a sua conformação possa se encontrar em um *folding* semelhante ao da proteína na sua forma nativa, e assim, maiores chances dos anticorpos produzidos possuírem paratopos que sejam capazes de reconhecer epitopos idênticos ao da proteína nativa.

Com a realização da hidridização *in vitro* entre as células do baço do camundongo imunizado e as células Sp2/O, produziu-se um painel de cinco MAbs anti-rlnIA. Nos experimentos subseqüentes realizados com os MAbs purificados observou-se que estes apresentaram uma constante de afinidade média, e que o MAb 3C5 apresentou o melhor resultado, com $K_a=7 \times 10^7 \text{ L.mol}^{-1}$. Isso demonstra que esse MAb requererá uma baixa concentração de antígeno para saturar seus

paratopos, alcançar o equilíbrio (antígeno-anticorpo) e, dessa forma, detectar melhor o antígeno (FRIGUET et al., 1985).

Quando os MAbs foram avaliados em ELISA indireto com a proteína InIA nativa, melhores resultados foram obtidos nas cepas de *L. monocytogenes* cultivadas em caldo LEB, do que no meio não seletivo LB. Embora não se saiba por que isso ocorreu, pressupõem-se que houve uma auto-regulação da expressão da proteína InIA quando se utilizou o meio LEB, provavelmente por ação dos seus agentes seletivos, tais como, alta concentração de sal e antibióticos. Esse resultado vem ao encontro dos dados observados por Hearty et al. (2006), os quais verificaram diferenças no reconhecimento da InIA quando *L. monocytogenes* foi cultivada em caldo LEB ou em caldo BHI (caldo infusão cérebro-coração), encontrando melhores absorbâncias no ELISA realizado em cepas cultivadas em caldo LEB, e sugeriram que haveria uma pressão de seleção favorecendo a expressão da proteína InIA quando as cepas foram cultivadas em meio seletivo.

Recentemente, Lathrop et al. (2008) avaliaram a expressão da proteína InIB em meios seletivos e não seletivos para *L. monocytogenes* e encontraram uma redução drástica quando foram utilizados os meios seletivos LEB, Caldo Fraser e UVM (University of Vermont Medium), ao ponto da expressão da InIB cessar completamente. Em contraste, quando se utilizaram os meios não seletivos LB e BHI, a expressão da InIB foi alta em todas as cepas. Este fato poderia nos induzir a relacionar e repensar a interação entre a expressão da InIA e InIB, já que essas estão vinculadas ao mesmo *operon*, portanto, diretamente atrelados aos mesmos fatores de transcrição. Porém, os dados obtidos neste estudo e por Hearty et al. (2006) sugerem que a InIA é regulada de forma diferente da InIB.

Alguns trabalhos realizados verificando a expressão da proteína InIA e InIB observaram diferenças significativas na expressão entre cepas clínicas e de alimentos, demonstrando um nível mais baixo de expressão nas cepas clínicas do que nas cepas providas de alimentos (LONGHI, et al., 2004; WERBROUCK et al., 2006; RAMASWAMY et al., 2007). Desta forma as cepas isoladas de alimentos podem ter um alto grau de virulência devido a expressão da proteína InIA, além de serem reconhecidas mais facilmente por anticorpos contra esta proteína.

Verificou-se que os MAbs não reconheceram a InIA nativa nos ensaios realizados por ELISA indireto quando *L. monocytogenes* sofreu tratamento térmico a

100°C. Isso pressupõe que a proteína tenha desnaturado perdendo sua conformação nativa, alterando o epítipo de reconhecimento da InlA nativa, o que impediria a ligação dos MAb's ou, ainda, que pouco antígeno, especificamente, a proteína InlA da bactéria lisada, fique aderido à placa de ELISA. Hipóteses semelhantes foram sugeridas em outro estudo, no qual os baixos índices de reconhecimento da InlA após aquecimento foram atribuídos a solubilização e/ou desnaturação da proteína, ou que a superfície topográfica da bactéria é alterada, tornando a proteína InlA menos acessível à ligação com o anticorpo (Hearty et al., 2006). Heo et al. (2007) relataram a obtenção de dois MAb's que reagem com *L. monocytogenes* (menos com os sorotipos 4c e 4e) e *L. innocua*, sendo que um desses MAb's reagiu com as bactérias mortas por aquecimento.

A hipótese de desnaturação da proteína quando submetida ao tratamento térmico não pôde ser confirmada, por que no *Western blot* a maioria dos MAb's foi capaz de reconhecer a proteína nativa. Apenas o MAb 1H2 não reconheceu a proteína InlA na forma linearizada (desnaturada), provavelmente por reconhecer especificamente um epítipo conformacional. Salienta-se que, mesmo com a proteína na forma nativa, esse MAB demonstrou fraca ou pouca ligação. O fato dos outros quatro MAb's (3C5, 3C6, 5H6 e 3A12) reconhecerem a InlA por ELISA indireto e por *Western blot* sugere que o epítipo que eles reconhecem possivelmente seja linear, isto é, não sofre as consequências dos processos de desnaturação.

O MAb 3A12 demonstrou uma reação fraca com *L. innocua* no ELISA indireto. Provavelmente essa reação tenha ocorrido por que esta espécie, assim como *L. ivanovii* (BIERNE et al., 2007) e *L. welshimeri* (HAIN et al, 2006) possuem algumas internalinas que podem vir a ter uma região ou epítipo semelhantes. Interessantemente, através de *Western blot*, não se observou reação com proteínas de *L. innocua* e *L. seeligeri* por nenhum dos MAb's, o que caracteriza uma reação inespecífica somente através de ELISA com o MAb 3A12.

Quando se utilizou a proteína nativa nos testes de ELISA indireto, os melhores resultados foram obtidos com o sorotipo 4b (cepa clínica e de alimento). Esse resultado é extremamente interessante, uma vez que esse sorotipo é o mais implicado nos casos e surtos de listeriose causados por alimentos (CHURCHILL; LEE; HALL, 2006). Todavia, o reconhecimento dos outros sorotipos (4d, 1/2a e 1c) por *Western blot* sugere que esses também poderão ser reconhecidos através de

ELISA indireto, após otimização da técnica, ou por outros métodos, como imunofluorescência.

A técnica de *Dot blot* realizada com a proteína rInIA demonstrou-se eficaz para ser utilizada como um método rápido e específico para identificação de reatividade de MAbs com proteínas recombinantes. Embora ainda haja necessidade de padronizar este método com as proteínas em sua forma nativa (bactérias), essa técnica mostra potencial para futuras aplicações. Bhunia et al. (1991) utilizaram o teste de *Dot blot* para avaliar a reatividade com as bactérias e conseguiram realizar uma diferenciação adequada através desta técnica.

É importante ressaltar que até o momento não há relatos de produção de MAbs anti-intestinalina A de *L. monocytogenes* a partir de proteínas recombinantes. Yu et al., em 2000, relataram a produção de MAbs anti-p60, utilizando como imunógeno uma proteína recombinante p60, e os MAbs produzidos, além de identificarem apenas a proteína em solução, demonstraram reação cruzada com *L. innocua*, haja vista que aquela proteína também é produzida por esta espécie bacteriana.

A produção e caracterização dos MAbs contra InIA obtidos neste trabalho busca solucionar os principais problemas apresentados pela maioria dos MAbs relatados até hoje, ou seja, a incapacidade de detectar todos os sorotipos de *L. monocytogenes* e de ser específico para esta espécie.

Embora os resultados obtidos sejam promissores e reforçarem a escolha da InIA como alvo para a produção de MAbs, ainda é necessário avaliar a reação dos MAbs com outros sorotipos de *L. monocytogenes*, assim como, com outras espécies de *Listeria* não patogênicas e outras bactérias Gram-positivas e negativas, a fim de descartar qualquer possibilidade de reações cruzadas.

7 CONCLUSÕES

- O fragmento de InlA expresso em *E. coli* estimula uma resposta imune humoral em camundongos BALB/c que reconhece as formas recombinantes e nativa da proteína;
- Foram obtidas cinco linhagem de hibridomas estáveis secretores de anticorpos do isotipo IgG1 contra InlA;
- Todos os MAbs reagem especificamente em ELISA indireto com *L. monocytogenes* vivas, e não reagem com células mortas por tratamento térmico;
- Quatro MAbs (3C5, 3A12, 5H6, 3C6) reconhecem a InlA nativa em *Western blot*;
- Os MAbs produzidos possuem potencial para uso no desenvolvimento de imunoensaios de detecção de *L. monocytogenes*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUADO, V.; VITAS, A.I.; GARCÍA-JALÓN, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p.341-347, 2004.
- ANTONIOLO, P.C; BANDEIRA, F.D.; JANTZEN, M.M.; DUVAL, E.H., DA SILVA, W.P. Prevalence of *Listeria* spp. in feces and carcasses at a lamb packing plant in Brazil. **Journal of Food Protection**. v. 66, n. 2, p. 328-330, 2003.
- AURORA, R.; PRAKASH, A.; PRAKASH, S.; RAWOOL, D.B.; BARBUDDHE, S.B. Comparison of PI-PLC based assays and PCR along with in vivo pathogenicity tests for rapid detection of pathogenic *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.19, p.641-647, 2008.
- AZEVEDO, I.; REGALO, M.; MENA, C.; ALMEIDA, G.; CARNEIRO, L.; TEIXEIRA, P.; HOGG, T.; GIBBS, P. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. **Food Control**. v. 16, p. 121-124, 2005.
- BELL, C., KYRIAKIDES, A. *Listeria. A practical approach the organism and its control in foods*. London, UK, Blakwell Publishing, 288p., 2005.
- BIERNE, H.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 71, n. 2, p.377-397, 2007.
- BIERNE, H.; SABET, C.; PERSONNIC, N., COSSART, P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection** v. 9, p.1156-1166, 2007.
- BHUNIA, A.K.; BALL, P.H; FUAD, A.T.; KURZ, B.W.; EMERSON, J.W.; JOHNSON, M.G. Development and characterization of a monoclonal antibody specific for *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 9, p.3176-3184,1991.
- BHUNIA, A.K.; JOHNSON, M.G. Monoclonal antibody specific for *Listeria monocytogenes* associated with a 66-Kilodalton cell surface antigen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n.6, p.1924-1929, 1992.
- BOBROVNIK, S. A. Determination of antibody affinity by ELISA. Theory. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, n. 57, p.213-236, 2003.
- BORUCKI, M.K.; CALL, D.R. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5537-5540, 2003.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248-254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasil nº 7-E, p. 46-53 Jan, seção. 2001.

BUTMAN, B.T.; PLANK, M.C.; DURHAM, R.J.; MATTINGLY, J.A. Monoclonal antibodies which identify a genus-specific *Listeria* antigen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p.1564-1569, 1988.

CABANES, D.; DEHOUX, P.; DUSSURGET, O.; FRANGEUL, L.; COSSART, P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 5, p.238-245, 2002.

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

CEVENINI, R.; SAMBRI, V.; PILERI, S.; RATTI, G.; LA PLACA, M. Development of transplantable ascites tumours which continuously produce polyclonal antibodies in pristane primed BALB/c mice immunized with bacterial antigens and complete Freund's adjuvant. **Journal of Immunological Methods**, v.140, n.1, p. 111-118, 1991.

CHEN, Y.; KNABEL, S.J. Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Bacteria of the Genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and Major Serotypes and Epidemic Clones of *L. monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 19, p.6299-6304, 2007.

CHOU, C.H.; WANG, C. Genetic relatedness between *Listeria monocytogenes* isolates from seafood and humans using PFGE and REP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p.135-148, 2006.

CHURCHILL, R.L.T.; LEE, H.; HALL, J.C. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p.141-170, 2006.

COSSART, P.; JONQUIÈRES, R. Sortase, a universal target for therapeutic agents against Gram-positive bacteria? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS**, v. 97, n.10, p.5013-5015, 2000.

COSSART, P.; SANSONETTI, P.J. Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. **Science**, v. 242, p.242-248, 2004.

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

CZUPRYNSKI, C. J ; FAITH, N. G.; STEINBERG, H. Ability of the *Listeria monocytogenes* Strain Scott A To Cause Systemic Infection in Mice Infected by the Intragastric Route **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p.2893-2900, 2002.

DALTON, C.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P.M. An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria monocytogenes* in Milk. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 2, p.100-106, 1997.

DARJI, A.; NIEBUHR, K.; HENSE, M.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, T.; WEISS, S. Neutralizing Monoclonal Antibodies against Listeriolysin: Mapping of Epitopes Involved in Pore Formation. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p.2356–2358, 1996.

DHAR, G.; FAULL, K.F.; SCHNEEWIND, O. Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. **Biochemistry**, v. 39, p.3725-3733, 2000.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p.173-175, 2003.

DRAMSI, S., KOCKS, C., FORESTIER, C., COSSART, P., Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature, and the pleiotropic activator prfA. **Molecular Microbiology**, v. 9, n. 5, p.931-941, 1993.

DUFFY, G.; SHERIDAN, J.J.; HOFSTRA, H.; McDOWELL, D.A.; BLAIR, I.S. A comparison of immunomagnetic and surface adhesion immunofluorescent techniques for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* in meat. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, p. 445-450, 1997.

DUGGAN, J., PHILIPS, C.A. *Listeria* in the domestic environment. **Nutrition Food Science**, v. 2, p73-79, 1998.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review Microbiology**, v. 58, p.587-610, 2004.

ERDENLIG, S.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. Production of monoclonal antibodies to *Listeria monocytogenes* and their application to determine the virulence of isolates from channel catfish. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2827-2832, 1999.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FSIS. Recall cases Archive. Food Safety and Inspection Service, United State Department of Agriculture. Disponível em:
<http://www.fsis.usda.gov/Fsis_Recalls/Recall_Case_Archive/index.asp>. Acesso em: 15 de março 2008.

FRIGUET, B.; CHAFFOTTE, A. F.; DJAVADI-OHANIANCE, L.; GOLDBERG, M. E.; Measurements of the true affinity constant in a solution of antigen-antibody

complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Immunological Methods** 77: 305-319. 1985.

GAILLARD, J.L.; BERCHE, P.; MOUNIER, J.; RICHARD, S.; SANSONETTI, P. In Vitro Model of Penetration and Intracellular Growth of *Listeria monocytogenes* in the Human Enterocyte-Like Cell Line Caco-2. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p.2822-2829, 1987.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p.1-15, 2007.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, n. 5, p. 851-875, 2005.

GEKARA, N.O.; WEISS, S. Mast cells initiate early anti-*Listeria* host defences. **Cellular Microbiology**, v. 10, n.1, p.225-236, 2008.

GENG, T.; KIM, K.P.; GOMEZ, R.; SHERMAN, D.M.; BASHIR, R.; LADISCH, M.R.; BHUNIA, A.K. Expression of cellular antigens of *Listeria monocytogenes* that react with monoclonal antibodies C11E9 and EM-7G1 under acid-, salt- or temperature-induced stress environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p.762–772, 2003.

GENG, T.; MORGAN, M.T.; BHUNIA, A.K. Detection of low levels of *Listeria monocytogenes* cells by using a fiber-optic immunosensor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p.6138–6146, 2004.

GLASER, P.; FRANGEUL, L.; BUCHRIESER, C.; RUSNIOK, C.; AMEND, A.; BAQUERO, F.; et al. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**. v. 294, p.849-852, 2001.

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p.55-62, 2001.

GRAY, K.M.; BHUNIA, A.K. Specific detection of cytopathogenic *Listeria monocytogenes* using a two-step method of immunoseparation and cytotoxicity analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p.259-268, 2005.

GREGORY, S.H.; SAGNIMENI, A.J.; WING, E.J. Expression of the inlAB Operon by *Listeria monocytogenes* Is Not Required for Entry into Hepatic Cells In Vivo. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 10, p.3983-3986, 1996.

HAAS, J.; KUSINSKI, K.; PORE, S.; SHADMAN, S.; VAHEDI, M. A Ride with *Listeria monocytogenes*: A Trojan Horse. **Eukaryon**, v. 3, p.47-54, 2007.

HAIN, T., STEINWEG, C., KUENNE, C.T., BILLION, A., GHAI, R., CHATTERJEE, S.S., DOMANN, E., KARST, U., GOESMANN, A., BEKEL, T., BARTELS, D., KAISER, O., MEYER, F., PUHLER, A., WEISSHAAR, B., WEHLAND, J., LIANG, C.,

DANDEKAR, T., LAMPIDIS, R., KREFT, J., GOEBEL, W., CHAKRABORTY, T. Whole-Genome Sequence of *Listeria welshimeri* Reveals Common Steps in Genome Reduction with *Listeria innocua* as Compared to *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 21, p.7405-7415, 2006.

HAIN, T.; CHATTERJEE, S.S.; GHAI, R.; KUENNE, C.T. et al. Pathogenomics of *Listeria* spp. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 297, p. 541–557, 2007.

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

HEARTY, S.; LEONARD, P.; QUINN, J.; O'KENNEDY, R. Production, characterisation and potential application of a novel monoclonal antibody for rapid identification of virulent *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiology Methods**, v. 66, n. 2, p.294-312, 2006.

HEO, S.A.; NANNAPANENI, R.; STORY, R.; JOHNSON, M.G. Characterization of new hybridoma clones producing monoclonal antibodies reactive against both live and heat-killed *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p.8-15, 2007.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **Immunology and Medical Microbiology**, v. 35 p. 199-202, 2003.

HOFER, E.; REIS C.M. F.; HOFER C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 32-37, 2006.

HONG, E.; DOUMITH, M.; DUPERRIER, S.; GIOVANNACCI, I.; MORVAN, A.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001. **International Journal of Food Microbiology** v. 114, p.187-194, 2007.

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

IRETON, K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 6, p.1365-1375, 2007.

JANTZEN, M.M.; NAVAS, M.J.; PAZ, M.; RODRIGUEZ, B.M.; SILVA, W.P; NUÑEZ, M.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. Evaluation of ALOA plating medium for its suitability to recover high pressure-injured *Listeria monocytogenes* from ground chicken meat. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 313-317, 2006a.

JANZTEN, M. M.; NAVAS, J.; CORUJO, A.; MORENO, R.; LÓPEZ, V.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PC. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p.235-247, 2006b.

JOUGLARD, S. D., MEDEIROS, M. A., VAZ, E. K., BASTOS, R. G., DA 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, 234, 2002.

JUNTTILA, J.R.; NIEMELA, S.I.; HIRN, S.J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 65, p. 321-327, 1988.

KAJAVA, A. V. Structural Diversity of Leucine-rich Repeat Proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 277, p.519-527, 1998.

KATHARIOU, S.; MIZUMOTO, C.; ALLEN, R.D.; FOK, A. K.; BENEDICT, A. A. Monoclonal Antibodies with a High Degree of Specificity for *Listeria monocytogenes* Serotype 4b. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3548-3552, 1994

KIM, S.H.; PARK, M.K.; KIM, J.Y.; CHUONG, P.D.; LEE, Y.S; YOON, B.S.; HWANG, K.K; LIM, Y.K. Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. using specific flagella antibodies. **Journal of Veterinary Science**, v. 6, n. 1, p. 41-46, 2005.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p.495-497, 1975.

LAER, A.E.V.; LIMA, A.S.; TRINDADE, P.S.; SILVA, W.P. Monitoramento de *Listeria monocytogenes* em planta de processamento de lingüiça mista frescal localizada em Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**. v. 1, n. 3, p.192-198, 2005.

LATHROP, A.A.; JARADAT, Z.W.; HALEY, T.; BHUNIA, A.K. Characterization and application of a *Listeria monocytogenes* reactive monoclonal antibody C11E9 in a resonant mirror biosensor. **Journal of Immunological Methods**, v. 281, p.119-128, 2003.

LATHROP, A.A.; BANADA, P.P.; BHUNIA, A.K. Differential expression of InlB and ActA in *Listeria monocytogenes* in selective and nonselective enrichment broths. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p.627-639, 2008.

LECUIT, M.; OHAYON, H.; BRAUN, L.; MENGAUD, J.; COSSART, P. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. **Infection and Immunity**. v. 65, n. 12, p.5309-5319, 1997.

LECUIT, M.; DRAMSI, S.; GOTTARDI, C.; FEDOR-CHAIKEN, M.; GUMBINER, B.; COSSART, P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity

towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. **The EMBO Journal**, v.18, n.14, p.3956–3963, 1999.

LECUIT, M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. **Clinical Microbiology Infection**. v.11, p 430-436, 2005.

LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection**. v. 9, p.1216-1225, 2007.

LIMA, A.S.; LAER, A.E.V; TRINDADE, P.S.; SILVA, W. P. Disseminação de *L. monocytogenes* no processamento de lingüiça mista frescal avaliada por sorologia e RAPD. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 3, p.245-251, 2005.

LIN, M.; TODORIC, D.; MALLORY, M.; LUO, B.S.; TROTTIER, E.; DAN, H. Monoclonal antibodies binding to the cell surface of *Listeria monocytogenes* serotype 4b. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p.291-299, 2006.

LOW, J. C.; DONACHIE, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **The Veterinarian journal**. v. 153, p. 9-29, 1997.

LONGHI, C.; MAFFEO, A.; PENTA, M.; PETRONE, G.; SEGANTI, L.; CONTE, M.P. Detection of *Listeria monocytogenes* in italian-style soft cheeses. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p.879-885, 2003.

LONGHI, C.; CONTE, M.P.; PENTA, M.; COSSU, A.; ANTONINI, G.; SUPERTI, F.; SEGANTI, L. Lactoferricin influences early events of *Listeria monocytogenes* infection in THP-1 human macrophages. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 87-91, 2004.

LÜDTKE, C. B.; COUTINHO, M. L.; JOUGLARD, S. D. D.; MOREIRA, C. N.; FERNANDES, C. P. H.; BROD, C. S.; HAAKE, D. A.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Monoclonal antibodies against an outer membrane protein from pathogenic leptospira. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p.1-4, 2003.

LUERCE, T. D.; SIMIONATTO, S.; DELLAGOSTIN, O. A., 2006, In: XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-Graduação. Clonagem, expressão e purificação da região c-terminal do gene *dnaK* de *Mycoplasma hyopneumoniae* em *Escherichia coli*. Anais do XV Congresso de Iniciação Científica e VIII Encontro de Pós-Graduação, 2006.

McLAUHLIN, J.; BLACK, A.; GREEN, I.H.T; NASH, J.Q.; TAYLOR, A.G. Monoclonal antibodies show *Listeria monocytogenes* in necropsy tissue samples. **Journal of Clinical Pathology**, v. 41, p. 983-988, 1988.

McLAUHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, v.7, n 4/5, p. 187-193, 1996.

MCGANN, P.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. The Alternative Sigma Factor σ_B and the Virulence Gene Regulator PrfA Both Regulate Transcription of *Listeria*

monocytogenes Internalins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 9, p.2919-2930, 2007.

MEAD, P.S.; DUNNE, E. F.; GRAVES, L.; WIEDMANN, M.; PATRICK, M.; HUNTER, S.; SALEHI, E.; MOSTASHARI, F.; CRAIG, A.; MSHAR, P.; BANNERMAN, T.; SAUDERS, B.D.; HAYES, P.; DEWITT, W.; SPARLING, P.; GRIFFIN, P.; MORSE, D.; SLUTSKER, L.; SWAMINATHAN, B. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 4, p. 744-751, 2006.

MENGAUD, J.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; MÈGE, R.M.; COSSART, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, v. 84, p.923–932, 1996a.

MENGAUD, J.; LECUIT, M.; LEBRUN, M.; NATO, F.; MAZIE, J.C.; COSSART, P. Antibodies to the Leucine-Rich Repeat Region of Internalin Block Entry of *Listeria monocytogenes* into Cells Expressing E-Cadherin. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 12, p. 5430–5433, 1996b.

MOREIRA, A.N.; CONCEIÇÃO, F.R.; MENDONÇA, M.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; CARVALHAL, J.B.; DELLAGOSTIN, O.A.; ALEIXO, J.A.G. Produção de anticorpos monoclonais por imunização genética: Clonagem do gene omp de *Salmonella Enteritidis* em Plasmídeo de expressão em *Escherichia coli*. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, p.198-198. 2007.

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 and Immunochemistry**, v. 29, n.1, p.58-69, 2008.

NALÉRIO, E.S. **Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva do frango do sul do Rio Grande do Sul**. 2007, 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) DCTA-FAEM, Universidade Federal de Pelotas.

NIGHTINGALE K. K.; SCHUKKEN, Y. H.; NIGHTINGALE, C. R.; FORTES, E. D.; HO, A.J.; HER, Z.; GROHN, Y.T.; MCDONOUGH, P. L.; WIEDMANN, M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm Environment. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 8, p. 4458-4467, 2004.

NIGHTINGALE, K. K.; WINDHAM, K.; WIEDMANN, M. Evolution and Molecular Phylogeny of *Listeria monocytogenes* Isolated from Human and Animal Listeriosis Cases and Foods. **Journal of Bacteriology**. v. 187, n. 16, p.5537-5551, 2005.

PRON, B.; BOUMAILA, C.; JAUBERT, F.; BERCHE, P.; MILON, G.; GEISSMANN, F.; GAILLARD, J.L. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 5, p.331-340, 2001.

POYART, C.; TRIEU-CUOT, P.; BERCHE, P. The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, 142, 173-180. 2003.

PAOLI, G.C.; CHEN, C.Y.; BREWSTER, J. D. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes*. **Journal of Immunology Methods**, v. 289, p.147-155, 2004.

TAKAHASHI, T.; OCHIAI, Y.; MATSUDATE, H.; HASEGAWA, K.; SEGAWA, T.; FUKUDA, M.; HONDO, R.; UEDA, F. **Isolation of *Listeria monocytogenes* from the Skin of Slaughtered Beef Cattle**. Journal of Veterinary Medical Science. v. 69, n.10, p 1077–1079, 2007.

THAM, W.; LOPEZ-VALLADARES G.; HELMERSSON, S.; ÖSTERLUND, V.; DANIELSSON-THAM, M.L. More than one variant of *Listeria monocytogenes* isolated from each of two human cases of invasive listeriosis. **Epidemiology and Infection**. v. 135, p.854-856, 2007.

TORRES, K.; SIERRA, S.; POUTOU, R.; CARRASCAL, A.; MERCADO, M. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. **MVZ-Córdoba**. v. 10, p. 511-543, 2005.

TULLY, E.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O’KENNEDY, R. The development of rapid fluorescence-based immunoassays, using quantum dot-labelled antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 39, p. 127–134, 2006.

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

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V. M.; REJITHA, J. S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K. S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H. M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, v. 40, p.4-13, 2007.

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. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 37, n.8, 2004.

RAWOOL, D. B.; MALIK, S. V. S; SHAKUNTALA, I.; SAHARE, A.M; BARBUDDHE, S.B. Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. **International Journal of Food Microbiology**. v. 113, p.201-207, 2007.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (eds). Food Microbiology: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press.. p. 337-352. 1997.

ROCOURT, J.; BENEMBAREK, P.; TOYOFUKU, H.; SCHLUNDT, J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. **Immunology and Medical Microbiology**. v. 35, p.263-267, 2003.

ROSENBERG, A. H.; LADE, B. N.; CHUI, D. S.; LIN, S. W.; DUNN, J. J.; STUDIER, F. W. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. **Gene**, v. 56, p.125-135, 1987.

SAMBROOK, J. AND RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.

SCHLECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, v.308, n.4, p.203-206, 1983.

SCHLECH, W.F. Foodborne Listeriosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, p.770–775, 2000.

SCHUBERT W.D.; URBANKE, C.; ZIEHM T.; BEIER, V., MACHNER, M.P; DOMANN, E.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, J.; HEINZ D.W. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with Its Human Receptor E-Cadherin. **Cell**, v. 111, n. 13, p.825-836, dec. 2002.

SCHUBERT, W.D; GÖBEL, G.; DIEPHOLZ, M.; DARJI, A.; KLOER, D.; HAIN, T.; CHAKRABORTY, T.; WEHLAND, J.; DOMANN, E.; HEINZ, D.W. Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. **Journal of Molecular Biology**, v. 312, n. 4, p.783-794, 2001

SERGELIDIS, D.; ABRAHIM, A.; SARIMVEI, A.; PANOULIS, C.; KARAIIOANNOGLOU, P.; GENIGEORGIS, C. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. **International Journal of Food Microbiology**. v. 34, p. 171-177, 1997.

SIRAGUSA, G.R.; JOHNSON, M.G. Monoclonal antibody specific for *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, and *Listeria welshimeri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p.1897-1904, 1990.

SIMIONATTO, S.; VAZ, E. K; MICHELON, A.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O.A. Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, p. 84-90, 2005.

SILVA, W. P.; TECHERA, S. B. C.; JANTZEN, M.M.; LAER, A.N.V.; LIMA, A.S.; MATA, M.M. *Listeria monocytogenes* en quesos tipo Minas producidos artesanalmente y comercializados en Pelotas, RS, Brasil. **Alimentaria**, Madrid, n. 359, p. 57-60, 2004.

SKJERVE, E.; RORVIK, L.M.; OLSVIK, O. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n.11, p.3478-3481, 1990.

VARSHNEY, B. C.; PONNANNA, N. M.; SARKAR, P. A.; REHMAN, P.; SHAH, J. H. Development of a monoclonal antibody-based co-agglutination test to detect enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic neonatal calves. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p.57-64, 2007.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p.584-640, 2001.

VIEIRA, M. L.; D'ATRI, L. P.; SCHATTNER, M.; HABARTA, A. M.; BARBOSA, A.S.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; ABREU, P. A.E.; GÓMEZ, R. M.; NASCIMENTO, A.L.T.O. A novel leptospiral protein increases ICAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells. **Microbiology Letters**, v. 276, n. 2, p.172-180, 2007.

WALLS, I. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis-a risk-based approach. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 9, p. 1932-1994, 2005.

WANG, H.; LI Y.; SLAVIK, M. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using quantum dots and nanobeads-based optical biosensor. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 15, p.67-76, 2007.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16s ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p.697-703, 1991.

WERBROUCK, H. GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; PAMEL, E.V.; RIJPENS, N.; DAMME, J.V.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; COILLIE, E.V. Differential *inlA* and *inlB* Expression and Interaction with Human Intestinal and Liver Cells by *Listeria monocytogenes* Strains of Different Origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p.3862-3871, 2006.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. technical report. <http://www.who.int/foodsafety>, 2004.

WHO/FAO. Proposed draft guidelines on the application of general principles of food hygiene to the [control] of *listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX COMMITTEE ON FOOD HYGIENE. Thirty-Seventh Session Buenos Aires, Argentina, March 14 – 19, 2005.

WING, E.J.; GREGORY, S.H. *Listeria monocytogenes*: Clinical and Experimental Update. **The Journal of Infectious Diseases**, v.185, p.18-24, 2002.

WIECKOWSKA-SZAKIEL, M., BUBERT, A., RÓŻALSKI, M., KRAJEWSKA, U., RUDNICKA, W., RÓŻALSKA, B., Colony-blot assay with anti-p60 antibodies as a method for quick identification of *Listeria* in food. **International Journal of Food Microbiology**. v. 72, p.63-71, 2002.

YU, K.Y.; NOH, Y.; CHUNG, M.; PARK, H.J. LEE, N.; YOUN, M.; JUNG, B.Y.; YOUN, B.S. Use of monoclonal antibodies that recognize p60 for identification of *Listeria monocytogenes*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 3, p. 446-451, 2004.

ZHANG, Y.; YE H. E.; HALL, G.; CRIPE, J.; BHAGWAT, A. A.; MENG, J. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. **International Journal of Food Microbiology**. v.113. p. 47-53, 2007.

ZHOU, X.; JIAO, X. Molecular grouping and pathogenic analysis of *Listeria monocytogenes* of clinical and food origin. **Food Control**, v. 16, p.867-872, 2005.

ZHU, Q.; ZHAO, S.; SOMERVILLE, R. L. Expression, purification, and functional analysis of the TyrR protein of *Haemophilus influenzae*. **Protein Expression and Purification**, v. 10, n. 237-246, 1997.