



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

# **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS IMUNOLÓGICOS E MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE SALMONELAS EM ALIMENTOS**

**ÂNGELA NUNES MOREIRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. José Antonio Guimarães Aleixo e co-orientação dos Profs. Odir Antônio Dellagostin e Fabricio Rochedo Conceição, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

PELOTAS  
Rio Grande do Sul - Brasil  
Outubro de 2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**ÂNGELA NUNES MOREIRA**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS IMUNOLÓGICOS E  
MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE SALMONELAS EM  
ALIMENTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. José Antonio Guimarães Aleixo e co-orientação dos Profs. Odir Antônio Dellagostin e Fabricio Rochedo Conceição, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

APROVADA: 24 de outubro de 2005

Banca examinadora:

Prof. Dr. Agueda Castagna de Vargas

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

**Dados de catalogação na fonte:**

Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M838d

Moreira, Ângela Nunes

Desenvolvimento de métodos imunológicos e moleculares para detecção de salmonelas em alimentos / Ângela Nunes Moreira ; orientador José Antonio Guimarães Aleixo ; co-orientador Odir Antônio Dellagostin e Fabrício Rochedo Conceição. – Pelotas, 2005. – 65f. : il. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

1.Biotecnologia. 2.Anticorpos monoclonais. 3.*Salmonella*. 4.*Salmonella typhimurium*. 5.Desenvolvimento de PCR. 6.Separação imunomagnética. 7.Alimentos. I.Aleixo, José Antonio Guimarães.II.Dellagostin, Odir Antônio. III.Conceição, Fabrício Rochedo. IV.Título.

CDD: 614.511

Dedico este trabalho, com amor,

A Deus

A meus pais

A meus irmãos e sobrinhos

A meu amor Fabricio

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado essa vida maravilhosa e essa oportunidade.

A meus pais, Francisco de Paula Moreira e Vera Maria Nunes Moreira, responsáveis pelo o que sou e por mais essa conquista importante, pelo amor, carinho e dedicação de uma vida inteira.

A meus irmãos, Ciça, Luiz Fernando e Andréia, e sobrinhos, Paula, Júnior, Kim, Raíssa e nenê que está chegando, pelo amor, amizade e apoio.

A meu amor, Fabricio Rochedo Conceição, que além de ser o amor da minha vida, contribuiu, orientou e me apoiou, com carinho e dedicação, nesse trabalho.

A meu orientador, Prof. Dr. José Antonio Guimarães Aleixo pela valiosa orientação, paciência, amizade e apoio.

A meu co-orientador Prof. Dr Odir Antonio Dellagostin e ao Prof. José Beiro Carvalhal, pelo valioso apoio, amizade e ensinamentos transmitidos.

A todos os professores e amigos do Centro de Biotecnologia e da Faculdade de Nutrição, pela amizade e colaboração nos experimentos.

Aos amigos, que estiveram presentes em todos os momentos, e em especial a Rita, Cláudia, Bilica, Mariana, Flávia, Núbia, Michele, André, Marcelo, Joana, Ângela e Alegani, pela amizade, carinho, incentivo e apoio.

Aos bolsistas e estagiários Fabiana, Paula, Karine, Roberta, Clarice, Cilene, Caroline, Leonardo, Gabriela e todos os outros que passaram pelo Laboratório de Imunologia Aplicada, pela amizade e colaboração nos experimentos.

Aos amigos e colegas dos Laboratórios de Biologia Molecular, Bacteriologia, Biopolímeros e de Análise de Alimentos, pela amizade e colaboração nos experimentos.

Ao Centro de Biotecnologia, pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado em Biotecnologia Agrícola.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realizar o curso de Nutrição, de Mestrado e Doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Secretaria de Ciência e Tecnologia do estado do RS pelo financiamento.

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

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. TRABALHO Nº 01</b> .....	13
<b>MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST SEROGROUP B SALMONELLAE: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND USE IN A SANDWICH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY</b>	
ABSTRACT .....	14
INTRODUCTION.....	14
MATERIAL AND METHODS.....	16
1. Bacteria and growth conditions .....	16
2. Preparation of the immunizing antigen .....	16
3. Immunization of mice .....	16
4. Production of MAbs .....	17
5. Production of ascitic fluid.....	17
6. Isotyping and purification of MAbs.....	18
7. Indirect ELISA .....	18
8. Immunoblotting.....	19
9. Affinity constants of MAbs .....	19
10. Additivity ELISA.....	20
11. Sandwich ELISA.....	20
12. Contamination of food samples .....	21
RESULTS.....	21
DISCUSSION.....	26
REFERENCES.....	28

<b>3. TRABALHO Nº 02.....</b>	<b>31</b>
<b>DESENVOLVIMENTO DE PCR ASSOCIADA À SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA PARA DETECÇÃO DE <i>Salmonella Typhimurium</i> EM CARNES</b>	
RESUMO .....	32
INTRODUÇÃO .....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
1. Bactérias, condições de cultivo e extração de DNA.....	34
2. Seleção dos <i>primers</i> .....	35
3. Desenvolvimento de um controle interno de amplificação (IAC) .....	36
4. PCR.....	37
5. Limite de detecção da PCR com DNA puro .....	38
6. Limite de detecção da PCR com células de <i>Salmonella</i> .....	38
7. Sensibilidade e especificidade da PCR.....	39
8. Microesferas magnéticas e anticorpo monoclonal (MAb).....	39
9. Sensibilização das microesferas com o MAb .....	39
10. Limites de detecção da IMS e da PCR associada à IMS .....	40
11. Desempenho da PCR associada à IMS com amostras de carne experimentalmente contaminadas.....	41
12. Metodologia convencional.....	42
RESULTADOS .....	43
1. Seleção dos <i>primers</i> .....	43
2. Desenvolvimento de um controle interno de amplificação (IAC) .....	43
3. Limite de detecção da PCR com DNA puro .....	44
4. Limite de detecção da PCR com células de <i>Salmonella</i> .....	44
5. Sensibilidade e especificidade da PCR.....	44
6. Sensibilização das microesferas com o MAb .....	45
7. Limites de detecção da IMS e da PCR associada à IMS .....	45
8. Desempenho da PCR associada à IMS com amostras de carne experimentalmente contaminadas.....	46
DISCUSSÃO .....	48
REFERÊNCIAS.....	56
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## RESUMO

MOREIRA, ÂNGELA NUNES. D.S. Universidade Federal de Pelotas, outubro de 2005. **Desenvolvimento de métodos imunológicos e moleculares para detecção de salmonelas em alimentos.** Professor Orientador: José Antonio Guimarães Aleixo. Co-orientadores: Odir Antonio Dellagostin e Fabrício Rochedo Conceição.

Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre as principais causas de toxinfecções alimentares no mundo todo. A metodologia convencional de detecção dessa bactéria em alimentos é trabalhosa e requer no mínimo 4 dias para obtenção de um resultado negativo e de 6 a 7 dias para identificação e confirmação de amostras positivas. Dessa forma, métodos rápidos, como o ensaio imunoenzimático do tipo ELISA, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a separação imunomagnética (IMS), têm sido desenvolvidos e comercializados para a detecção de salmonelas em alimentos. Entretanto, os kits disponíveis comercialmente no Brasil são importados e de custo elevado. Por esta razão, neste trabalho, métodos imunológicos e moleculares foram desenvolvidos para a detecção de salmonelas em alimentos. Para o desenvolvimento dos métodos imunológicos, dez anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para uma proteína de membrana externa (OMP) de salmonelas do sorogrupo B foram produzidos e caracterizados. Os MAbs foram utilizados como anticorpos de captura e detecção em um ELISA sanduíche para identificação de *S. Typhimurium* em carnes. O limite de detecção do ELISA foi  $10^5$  UFC/ml e ele foi capaz de detectar 1-10 UFC/25 g de carne de bovinos e de frango experimentalmente contaminadas. O tempo total do método foi de 57 h. Além disso, um reagente composto de microesferas magnéticas e MAb para uso em IMS foi desenvolvido. Esse reagente separou e concentrou eficientemente *S. Typhimurium* a partir de culturas puras e de carnes experimentalmente contaminadas. Para o desenvolvimento do método molecular PCR, uma seqüência de nucleotídeos específica de salmonelas (gene *fimA*) foi selecionada, *primers* foram desenhados e um controle interno de amplificação desenvolvido. Essa PCR apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, e limites de detecção de  $10^4$  UFC/mL e 1,5  $\mu$ g de DNA por reação. O reagente para IMS e a PCR para amplificação do gene *fimA* foram associadas com sucesso no desenvolvimento de um novo método para detecção de *S. Typhimurium* em carnes. O limite de detecção deste método, a partir de cultivos puros, foi de  $10^4$  UFC/mL, e a partir de carnes experimentalmente contaminadas foi de 1-10 UFC/25 g. O tempo total do método foi de 26 h.

## ABSTRACT

MOREIRA, ÂNGELA NUNES. D.S. Universidade Federal de Pelotas, October of 2005. **Development of immunological and molecular methods for detection of salmonellae in foods.** Adviser: José Antonio Guimarães Aleixo. Committee: Odir Antonio Dellagostin and Fabrício Rochedo Conceição.

*Salmonella* is a major cause of food-borne illness all over the world. Conventional cultural method for detection of this bacterium in foods is laborious and time-consuming, requiring at least 4 days to obtain negative results, and 6–7 days for identification and confirmation of positive samples. In this manner, rapid methods, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), polymerase chain reaction (PCR) and immunomagnetic separation (IMS), for the detection of salmonellae in foods have been developed and commercialized. However, kits commercially available in Brazil are all imported and have a high cost per sample tested. For these reasons, this work on development of immunological and molecular methods for detection of salmonellae in foods was started. For development of immunological methods, ten monoclonal antibodies (MAbs) specific for an outer membrane protein (OMP) of serogroup B salmonellae were produced and characterized. The MAbs were used as capture and detection antibody in a sandwich ELISA specific for detection of *S. Typhimurium* in meats. Detection limit of the sandwich ELISA was  $10^5$  CFU/ml and it was able to detect 1-10 CFU/25 g of beef and chicken samples experimentally contaminated. The total time of the assay was 57 h. Moreover, a reagent composed of magnetic beads and MAb for use in IMS was developed. This reagent was able to separate and concentrate efficiently *S. Typhimurium* from pure culture and artificially contaminated meat. For development of the molecular method PCR, a salmonellae-specific sequence of nucleotides (gene *fimA*) was selected, primers were designed and an internal amplification control (IAC) was developed. This PCR presented 100% of sensibility and specificity and detection limit of  $10^4$  CFU/ml of salmonellae and 1,5  $\mu$ g of DNA for reaction. The reagent for IMS and the PCR for amplification of gene *fimA* were associated with success in the development of a novel method for detection of *S. Typhimurium* in meats. The detection limit of this method from pure culture was  $10^4$  CFU/ml and from artificially contaminated meat, 1-10 CFU/25 g. The total time of the assay was 26 h.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Salmonelas são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Sua temperatura ótima de crescimento é 37°C, multiplicam-se na faixa de pH entre 4,5 e 9,5, em atividade de água acima de 0,93 e possuem mecanismos de adaptação a condições ambientais adversas. Produzem ácido e gás a partir da glicose e outros carboidratos e, geralmente, não utilizam lactose e sacarose. São oxidase negativa e catalase positiva e são capazes de crescer utilizando citrato como única fonte de carbono. Geralmente, produzem H<sub>2</sub>S, descarboxilam a lisina e ornitina e não hidrolisam a uréia. Sua identificação bioquímica presuntiva é tradicionalmente baseada nestas características (D´Aoust, 2001).

Bactérias do gênero *Salmonella* são divididas em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (POPOFF; LE MINOR, 1997). *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies (BRENNER et al., 2000) sendo a subespécie I (subespécie *enterica*) a que apresenta a maioria dos mais de 2.400 sorovares identificados e a que compreende os sorogrupos A a H (POPOFF; BOCKEMÜHL; BRENNER et al., 2000). Cepas dos sorogrupos A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D e E causam aproximadamente 99% das infecções em humanos e animais de sangue quente (POPOFF; LE MINOR, 1997). Já *Salmonella bongori* e as outras subespécies de *Salmonella enterica* são raramente isoladas de humanos, sendo geralmente isoladas de animais de sangue frio e do ambiente (FARMER et al., 1984).

*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovares Typhimurium e Enteritidis são os mais envolvidos em salmonelose humana (CDC, 2000; CDC, 2001; CDC, 2003; VUGIA et al. 2004). *Salmonella* Typhimurium foi o patógeno mais implicado em salmoneloses de origem alimentar no mundo todo até 1991 (TAUXE, 1991; MISHU et al., 1994) e entre 1997 e 2002 (CDC, 2004). Além disso, este sorovar e outros do sorogrupo B (*Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Saint Paul, *Salmonella* Derby e *Salmonella* Paratyphi B) estiveram entre os 20 sorovares mais comumente isolados de humanos nos Estados Unidos entre 1973 e 1996 (CDCa, 1996; CDCb, 1996). Atualmente, além de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis, os sorovares de salmonelas mais frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar são *S.* Heidelberg, *S.* Newport, *S.* Infantis, *S.* Agona, *S.* Montevideo, e *S.* Saint Paul (CHIU et al., 2005).

Salmonelas estão amplamente distribuídas no ambiente e residem, primariamente, no trato intestinal de aves, répteis, animais de estimação e de criação para o consumo, e de humanos (KERR et al., 1992). A transmissão de salmonelas ao homem ocorre, geralmente, pela ingestão de alimentos ou água contaminados (FAVRIN; JASSIM; GRIFFITHS, 2001). As fontes mais comuns de salmonelas são carnes, principalmente de frango, leite e ovos. Além destes, diversos alimentos podem ser envolvidos na transmissão, sejam eles crus, insuficientemente processados, mal cozidos ou que sofreram contaminação cruzada.

A grande maioria das salmonelas causa infecções localizadas no epitélio intestinal, conhecidas como salmoneloses. *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi* causam infecções sistêmicas, com conseqüências mais severas, conhecidas como febre tifóide (entérica) e paratifóide, respectivamente.

A salmonelose é uma doença de origem alimentar geralmente caracterizada por uma gastroenterite aguda auto-limitante. A dose infectante depende do sorovar e alimentos envolvidos, e do estado fisiológico do hospedeiro. Segundo a FDA (FDA/CFSAN, 2003), cerca de 15 células de salmonelas já podem causar a doença em pacientes imunocomprometidos e/ou quando ingeridas com alimentos gordurosos. Entretanto, a dose infectante em condições normais é de aproximadamente  $10^5$  células. Os sintomas mais comuns incluem diarréia, dores abdominais, vômitos e náuseas e podem ser acompanhados de prostração, dor muscular, sonolência e febre (JAY, 1992). Apesar de, geralmente, os sintomas se resolverem dentro de 5 dias, os microrganismos podem ser excretados nas fezes por muitas semanas. O período de incubação varia de 6 a 48 horas, com uma média de 12 a 36 horas. Este período e a gravidade da doença dependem da dose infectante, da virulência do microrganismo, da susceptibilidade do hospedeiro e da composição físico-química do alimento envolvido. Crianças, principalmente as menores de 1 ano, idosos e pacientes imunocomprometidos são mais susceptíveis à doença e tendem a ter infecções mais severas, como septicemia, que podem levar a morte (GOMEZ; CLEARY, 1998; DARWIN; MILLER, 1999).

A emergência de salmonelas resistentes a múltiplos antibióticos tem tornado os surtos de doenças de origem alimentar causados por esses patógenos ainda mais perigosos. Essa resistência é resultado da utilização indiscriminada de antibióticos em animais como agentes terapêuticos e como suplementos alimentares (em doses subterapêuticas), para promover o crescimento (RABSCH; TSCHÄPE;

BÄUMLER, 2001). Além disso, o uso desnecessário de antibióticos no tratamento da salmonelose também tem contribuído para essa resistência. *Salmonella* Typhimurium DT104, que é uma das principais cepas multi-resistentes a antibióticos, é, frequentemente, encontrada no trato gastrointestinal de bovinos, aves e suínos e pode contaminar o homem através da cadeia alimentar (DALY; FANNING, 2000).

Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os principais agentes causadores de doenças de origem alimentar no mundo todo (LEWIS, 1997; OLSEN et al., 2000). Segundo Mead et al. (1999), salmonela é responsável por cerca de 32% das mortes relacionadas a toxinfecções alimentares. Nos Estados Unidos, 2 a 4 milhões de casos de salmonelose são estimados por ano (USDA/ERS, 2003). Destes casos, mais de 500 são fatais. Neste país, no Canadá e na Austrália, infecções por salmonelas são a segunda principal causa de doenças de origem alimentar (KHAKRIA et al., 1997; MEAD et al. 1999; AHMED et al., 2000; THORNS, 2000; OZFOODNET WORKING GROUP, 2004). A incidência de salmonelose aumentou significativamente nas últimas décadas em vários países europeus. Na Alemanha, um total de 63.044 casos foi comunicado no ano de 2003 (ARNOLD et al., 2004). Em Hong Kong, salmonela foi um dos três principais agentes responsáveis por surtos de origem alimentar nos últimos anos (KONG; YEUNG 1999; MOK, 2001). No Brasil, salmonela é uma das principais responsáveis pelos elevados índices de mortalidade infantil (REIS; COSTA; SOLARI, 1993). No Rio Grande do Sul, bactérias do gênero *Salmonella* foram responsáveis por 32% das enfermidades de origem alimentar entre 1987 e 1997 (DVSSSMA, 1997) e por 35% entre 1997 e 1999 (COSTALUNGA; TONDO, 2002).

Apesar da altíssima incidência de surtos de salmonelose relatados no mundo todo, a magnitude do problema ainda é subestimada, pois a maioria dos casos não é notificada. Como a salmonelose é uma doença auto-limitante, muitas vezes ela não é diagnosticada corretamente. Além disso, como a maioria das pessoas infectadas não procura atendimento médico, amostras clínicas nem sempre são obtidas para testes laboratoriais e muitas vezes os resultados encontrados não são comunicados aos órgãos de saúde responsáveis (RABSCH; TSCHÄPE; BÄUMLER, 2001). Com isso, é estimado que o número de infecções não notificadas é 20 a 100 vezes maior do que as notificadas. Nos Estados Unidos, estima-se que o número de casos de salmonelose seja 38 vezes maior que o número de casos notificados (HEINITZ et al., 2000).

A ampla distribuição de salmonelas na natureza, a deficiência nas práticas de higiene e sanitização utilizadas na produção, industrialização e distribuição de alimentos, a utilização de rações contaminadas e o crescente comércio de alimentos em nível mundial têm contribuído para o aumento da incidência desse patógeno no mundo todo. Outros fatores que contribuem para esse incremento são: o aumento da proporção de idosos na população; do consumo de alimentos crus ou levemente cozidos; e do número de pacientes crônicos e imunocomprometidos (DARWIN & MILLER, 1999).

O número de surtos de toxinfecções alimentares causadas por salmonelas, anualmente, pode resultar em gastos de grande impacto econômico. Nos Estados Unidos, os 1,3 milhão de casos estimados em 2000 provocaram gastos de 2,4 bilhões de dólares em custos médicos e perda de produtividade (USDA/ERS, 2003).

Para evitar surtos de salmonelose, medidas apropriadas de controle de qualidade devem ser aplicadas em todas as fases da cadeia de produção de alimentos. Atualmente, estas medidas são baseadas no sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (SINELL, 1995; DREESEN, 1998). Além disso, é importante que se faça uma identificação do agente causador e intervenção precoce em surtos de toxinfecções. Por isso, métodos para detecção e monitoramento de salmonelas na produção animal primária, na indústria de alimentos e nos produtos finais necessitam serem rápidos, práticos, confiáveis e baratos (CROCI et al., 2004).

A metodologia convencional para detecção de salmonelas em alimentos é trabalhosa, apresenta custo operacional bastante elevado, em função da grande variedade de materiais e da mão de obra envolvidos na execução das análises, e requer um tempo relativamente longo para obter um resultado definitivo. São necessários, no mínimo, quatro dias para obtenção de um resultado negativo e 6 a 7 dias para identificação e confirmação de amostras positivas (FDA/BAM, 1998; FERRETTI et al., 2001). O longo tempo de análise é devido à utilização de três períodos de incubação, para obtenção de colônias típicas, e de testes de confirmação. O pré-enriquecimento das amostras ocorre em meio não seletivo e tem a finalidade de recuperar células lesadas. O enriquecimento em caldos seletivos permite a multiplicação de salmonelas a um nível detectável no plaqueamento e restringe a proliferação de outras bactérias. O plaqueamento em meios seletivos

visa o isolamento de colônias suspeitas que são submetidas a confirmação através de testes bioquímicos e sorológicos.

Embora a metodologia convencional continue sendo o padrão de referência para a detecção de salmonelas, ela apresenta uma sensibilidade limitada, já que requer que os caldos de enriquecimento conttenham um número de células viáveis suficiente para permitir seu isolamento em meio a microbiota competidora presente no alimento (CHAICUMPA et al., 1995). Além disso, outras bactérias que crescem nos meios seletivos, especialmente dos gêneros *Proteus* e *Citrobacter*, podem apresentar colônias com características semelhantes às de salmonela e prejudicar seu isolamento e identificação (RAMBACH, 1990). Outras limitações da metodologia convencional dizem respeito ao crescente número de sorotipos de salmonela que apresentam reações bioquímicas atípicas, como fermentação de lactose (FACH et al., 1999), e ao desenvolvimento de colônias de salmonela com morfologia diferente das descritas na literatura. Também os efeitos debilitantes da exposição de salmonelas a dessecação, radiação, baixas temperaturas e preservação pelo calor ou agentes químicos, durante o processamento dos alimentos, e a limitação de nutrientes podem resultar em células viáveis não cultiváveis, limitando a confiabilidade de métodos biológicos (DORAN et al., 1994). Assim, devido as limitações da metodologia convencional mencionadas e, principalmente, devido ao longo período de tempo requerido para a detecção de salmonelas em alimentos por essa metodologia, diversos métodos rápidos foram propostos nos últimos anos (BLACKBURN, 1993; SWAMINATHAN; FENG, 1994).

A maioria dos métodos rápidos para detecção de salmonelas em alimentos baseia-se na especificidade da reação antígeno-anticorpo, embora métodos baseados na hibridização de ácidos nucléicos (FITTS et al., 1983), na utilização de um bacteriófago específico para salmonelas (HIRSH; MARTIN, 1984) e na reação em cadeia da polimerase (PCR) (COHEN; MECHANDA; LIN, 1996; LIN; TSEN, 1999; FERRETI et al., 2001) também tenham sido propostos.

Ao desenvolver um novo método para detecção de salmonelas em alimentos, deve-se levar em consideração que essa detecção é dificultada pelo pequeno número normalmente presente nos alimentos, pela variada microbiota competidora e diversificada composição dos alimentos. O método deve apresentar alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, redução de tempo e mão de obra

envolvidos na análise e ser aplicável em todos os tipos de alimentos (ANDREWS, 1985).

Muitos métodos rápidos propostos não apresentam boa sensibilidade e especificidade devido à interferência da microbiota competidora, a componentes inibidores presentes nos alimentos, e a semelhança antigênica de salmonela com outras bactérias (BURTSCHER et al., 1999, CHE et al., 2000). Outros são muito complexos, requerendo equipamentos e reagentes caros ou um alto nível de habilidade técnica para serem executados (BLACKBURN, 1993; SWAMINATHAN & FENG, 1994; PELOW et al., 1999). Os métodos imunológicos e os baseados em PCR são os que, geralmente, apresentam maior facilidade de execução, rapidez na obtenção de resultados e boa sensibilidade e especificidade quando comparados à metodologia convencional de cultivo.

Dentre os métodos imunológicos, que se baseiam na especificidade da reação antígeno-anticorpo, os ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA são os mais utilizados, em função das vantagens que proporcionam. Existem vários formatos de ELISA, todos se caracterizando pelo fato da reação antígeno-anticorpo ocorrer ligada a uma fase sólida e ser revelada através de uma reação enzimática. Dependendo do substrato enzimático utilizado, a formação do produto poderá ser acompanhada de geração de cor, luz ou fluorescência. Este método apresenta várias vantagens, como rapidez na execução, possibilidade de automação, disponibilidade de imunoreagentes quimicamente estáveis e capacidade de analisar simultaneamente um grande número de amostras (CHAICUMPA et al., 1995). Entretanto, o sucesso de um ELISA depende de diversos fatores, que incluem as características da matriz sólida, a qualidade dos reagentes imunológicos, o sistema de detecção dos complexos imunológicos, o sistema de medida adotado e, principalmente, os anticorpos utilizados. Além disso, para garantir o bom desempenho do teste, em termos de sensibilidade, especificidade, repetibilidade e reprodutibilidade, é necessário padronizá-lo antes do uso, ou seja, determinar a concentração ótima dos reagentes imunológicos, achar o binômio tempo-temperatura de incubação ideal em cada etapa e utilizar controles negativos e positivos confiáveis (TIJSEN, 1985).

Atualmente, diversos ELISAs para detecção de salmonelas encontram-se disponíveis comercialmente. Entretanto, todos são importados e, por isso, apresentam um alto custo de análise, superior ao custo da metodologia

convencional de cultivo. Além disso, muitos apresentam limitações como: necessidade de etapas adicionais de enriquecimento das amostras para atingir um número de células detectável pelo sistema (SEO et al., 1999); dificuldade de detecção devido à presença de microbiota contaminante que inibe o crescimento das salmonelas e, conseqüentemente, interfere no limite de detecção (FELDSINE; NELSON; HUSTEAD, 1993); baixa especificidade devido à semelhança antigênica de salmonelas com outras bactérias encontradas nos alimentos (KEITH, 1997) e a reações inespecíficas dos anticorpos com componentes dos alimentos (BENNET et al., 1997); e utilização de anticorpos com pequeno espectro de reação, incapazes de detectarem a maioria dos sorovares (BLACKBURN, 1993).

Outro método imunológico que vem sendo muito empregado em microbiologia de alimentos é a separação imunomagnética (IMS). A IMS é um método de separação e concentração de microrganismos relativamente simples, que tem sido aplicado para aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de isolamento e detecção de microrganismos específicos (COLEMAN; CHICK; NYE, 1995). A IMS utiliza microesferas magnéticas de poliestireno, cobertas com anticorpos monoclonais ou policlonais específicos, para imunocaptura e remoção dos microrganismos de culturas líquidas através de um magneto (OLSVIK et al., 1994). No caso das salmonelas, a técnica tem sido utilizada para separá-las de outras enterobactérias antes de fazer o plaqueamento em ágar seletivo, substituindo a etapa de enriquecimento seletivo (MANSFIELD; FORSYTHE, 1996), associada à ELISA (CUDJOE; HAGTVEDT; DAINTY, 1995, MANSFIELD; FORSYTHE, 2001) ou PCR (RIJPENS et al., 1999, TRKOV et al., 1999, JENÍKOVÁ; PAZLAROVÁ; DEMNEROVÁ, 2000, LI; BOUDJELLAB; ZHAO, 2000, HSIH; TSEN, 2001, ŠPANOVÁ et al., 2001). A substituição da etapa de enriquecimento seletivo pela IMS é vantajosa, pois a concentração de agentes seletivos no caldo de enriquecimento pode ser tóxica para muitas salmonelas. Estudos comparativos entre a técnica de IMS, utilizando microesferas anti-salmonela disponíveis comercialmente, e caldos de enriquecimento convencionais, mostraram que a IMS teve eficiência igual ou maior do que os caldos (MANSFIELD; FORSYTHE, 1993; CUDJOE; KRONA; OLSEN, 1994). Outra vantagem da IMS é que ela aumenta a sensibilidade do teste ao qual foi associada, pois captura também as células subletalmente lesadas (OLSVIK et al., 1994). Além disso, quando associada à PCR, aumenta ainda mais a sensibilidade

desta, pois concentra as células alvo e as separa dos inibidores da reação e da microbiota competitiva (ŠPANOVÁ et al., 2003).

A grande maioria dos estudos de aplicação da IMS para detecção de microrganismos em alimentos utiliza microesferas sensibilizadas com anticorpos disponíveis comercialmente. Em nosso país, estas microesferas são importadas e, conseqüentemente, possuem custo elevado, o que dificulta a utilização desta tecnologia em laboratórios de análises clínicas, indústrias de alimentos e setores privados de prestação de serviços.

A especificidade dos métodos imunológicos disponíveis para detecção de microrganismos em alimentos depende diretamente da especificidade dos anticorpos. Podem ser utilizados anticorpos policlonais, monoclonais ou ambos.

Anticorpos policlonais são anticorpos obtidos a partir do soro de animais previamente imunizados com um antígeno. Neste caso, uma ampla variedade de clones de linfócitos B são ativados, cada um secretando um anticorpo específico para diferentes epitopos do antígeno. Estes anticorpos geralmente estão disponíveis na forma de antisoros, que são obtidos através de uma metodologia simples e rápida a partir de animais como coelhos e cabras. Eles podem ser purificados por meio de técnicas de precipitação ou cromatográficas, e ser armazenados por longos períodos, pois são quimicamente estáveis (HAGE, 1991). Entretanto, a utilização de anticorpos policlonais em métodos imunológicos para detecção de microrganismos em alimentos apresenta desvantagens, como a ocorrência de reações inespecíficas com outras bactérias e com componentes dos alimentos que provocam elevadas reações de fundo. Isso ocorre devido à heterogeneidade dos anticorpos obtidos e diminui a especificidade do teste (BROWN et al., 1996). Outra desvantagem é a quantidade limitada de anticorpos obtidos a partir de um único animal imunizado, o que faz com que seja necessária a utilização de vários animais e a produção de diversos lotes que apresentam grande variabilidade em características como classe, afinidade e especificidade. Devido a isso, é necessária a padronização de cada lote produzido, sendo impossível a obtenção de lotes de antisoros idênticos. Contudo, anticorpos policlonais purificados por cromatografia de afinidade são úteis como anticorpos primários ou secundários em ELISA.

Anticorpos monoclonais (MAbs) são imunoglobulinas secretadas por uma população geneticamente idêntica de células (clones) conhecidas como hibridomas e que reagem especificamente com apenas um determinante antigênico (epítopo) na

molécula do antígeno (GODING, 1986). A metodologia tradicional de obtenção de MAbs foi desenvolvida por Köhler e Milstein (1975) e envolve a fusão *in vitro* de células secretoras de anticorpos (linfócitos B) com células de mieloma (células de tumor de linfócitos B). Essa fusão resulta na obtenção de células imortalizadas secretoras de anticorpos específicos. A utilização de MAbs em métodos imunológicos para detecção de microrganismos em alimentos apresenta diversas vantagens sobre os anticorpos policlonais, como maior especificidade, disponibilidade de quantidade ilimitada de anticorpos, uniformidade e necessidade de uma única padronização. Contudo, a utilização de MAbs também pode apresentar limitações, como incapacidade de identificar todos os sorovares de um gênero ou espécie, possibilidade de reagir com determinantes antigênicos de outras bactérias que compartilham antígenos estruturais, e sensibilidade variada para diferentes sorovares de uma mesma espécie (KERR et al., 1992).

Dentre os métodos moleculares, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ótima alternativa para detecção rápida, sensível e específica de salmonelas em alimentos (MALORNY et al., 2003). Esta técnica, que é uma imitação da replicação do DNA, consiste na amplificação *in vitro* de seqüências específicas de DNA pela enzima DNA polimerase. Primeiramente, o DNA é submetido a uma etapa de desnaturação. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) se anelam às fitas de DNA complementares em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Assim a enzima DNA polimerase entra em ação e faz a extensão dos *primers* complementares ao DNA fita simples, utilizando os nucleotídeos presentes na reação. Após o término do ciclo, o DNA é desnaturado para a próxima etapa de anelamento e extensão, onde não somente o DNA inicial, mas também o produto da amplificação do ciclo anterior é utilizado como alvo. Como a seqüência de DNA é amplificada exponencialmente, a partir de uma cópia de DNA é possível obter bilhões de cópias da seqüência desejada em pouco tempo. Esta quantidade de DNA pode ser visualizada como uma banda em um gel de eletroforese corado com brometo de etídio, sob luz ultra-violeta.

Entre as principais vantagens da PCR para detecção de microrganismos em alimentos estão: a alta especificidade e sensibilidade; maior rapidez na obtenção de resultados; capacidade de detecção de microrganismos viáveis não cultiváveis (DORAN et al., 1994); possibilidade de diminuição, ou até mesmo de omissão, de etapas de enriquecimento após concentração da bactéria (LI; BOUDJELLAB; ZHAO,

2000) e de identificação e tipagem dos microrganismos através de suas características genéticas. Além disso, como a seqüência de DNA é praticamente invariável, a técnica não depende e não é influenciada pelas condições de crescimento do microrganismo e do ambiente.

A elevada sensibilidade da PCR permite que seqüências alvo sejam detectadas mesmo quando presentes em baixas concentrações, permitindo a detecção de populações bacterianas pequenas dentro de uma microbiota complexa. Entretanto, embora a reação de PCR seja capaz de amplificar a seqüência de DNA alvo a partir de um único microrganismo, o volume extremamente pequeno (1 a 10  $\mu$ L) de amostra de DNA utilizado na reação restringe o limite de detecção da PCR em, aproximadamente,  $10^2$  ou  $10^3$  células/mL. Por isso, apesar da alta sensibilidade da PCR, etapas de enriquecimento são necessárias para aumentar o número de células a um nível detectável. Além disso, esses enriquecimentos antes da PCR auxiliam na recuperação de células lesadas aumentando seu número em relação à concentração de inibidores, diluem células mortas e substâncias inibitórias para a reação presentes na matriz da amostra, aumentam a probabilidade de detecção de células vivas e possibilitam o isolamento do organismo alvo para testes complementares (SHARMA e CARLSON, 2000).

A sensibilidade e especificidade da PCR dependem de diversos fatores, entre eles as condições da reação, tais como temperatura de anelamento dos *primers* e concentrações de enzima, *primers* e magnésio. Estas condições precisam ser otimizadas para cada par de *primers* para minimizar ligações inespecíficas e permitir somente a amplificação da seqüência alvo, mesmo quando presente em pequenas quantidades. Outro fator que interfere na PCR é a qualidade do DNA extraído da bactéria, já que a presença de DNA e de células de outros organismos pode interferir na amplificação e afetar a sensibilidade e especificidade da PCR (WANG; CAO; JOHNSON, 1992). Para realizar uma PCR eficiente é necessário remover os componentes inibitórios associados aos alimentos, separar e concentrar os microrganismos da amostra e purificar eficazmente seu DNA (de BOER; BEUMER 1999).

Além disso, a sensibilidade e especificidade de uma PCR dependem das seqüências dos *primers* utilizados na amplificação. Por isso, é necessário utilizar seqüências de *primers* que sejam específicas do patógeno alvo. Os alvos mais comuns das PCRs são genes para produção de toxinas, enzimas específicas,

fatores de virulência, plasmídeos ou genes rRNA. Como salmonelas não apresentam um plasmídeo ou fator de virulência comprovadamente comum a todos os sorotipos (TRKOV; AVGUSTIN, 2003), e são intimamente relacionadas aos gêneros *Escherichia*, *Shigella* e *Citrobacter* (COHEN; MECHANDA; LIN, 1996), a seleção de alvos para amplificação se torna ainda mais difícil. Outro fator que interfere na especificidade de uma PCR é a ocorrência de contaminação das reações com DNA exógeno. Resultados falso-positivos podem ser obtidos com um mínimo de contaminação e podem ser monitorados pela inclusão de controles negativos e de reagentes (branco) além do controle positivo e interno de amplificação. Resultados falso-negativos e redução da sensibilidade podem ocorrer devido à degradação de ácidos nucléicos alvo e/ou *primers* através de nucleases, perda de amostra durante a extração de DNA, inibição ou redução da amplificação pela presença de substâncias quelantes de cátions de magnésio divalentes necessários para a PCR ou pela inibição direta da DNA polimerase (WILSON, 1997). Os inibidores incluem substâncias orgânicas e inorgânicas, como detergentes, antibióticos, componentes fenólicos, enzimas, polissacarídeos, ácidos graxos, proteínas e sais (ŠPANOVÁ et al., 2003).

A inclusão de controles internos de amplificação (IAC) é essencial para prevenir resultados falso-negativos, pois estes indicam a presença de substâncias inibidoras da PCR na amostra. O IAC é uma seqüência de DNA não alvo presente em todas as reações, que é amplificada simultaneamente com a seqüência alvo. Em uma PCR sem um IAC, um resultado negativo pode significar que a seqüência alvo não estava presente na reação (verdadeiro-negativo) ou que a reação foi inibida (falso-negativo), devido ao mau funcionamento do termociclador, preparação incorreta da mistura da PCR, problemas com a atividade da DNA polimerase, erro do operador ou presença de substâncias inibidoras (RADSTRÖM et al., 2003). Já em uma PCR com um IAC, esse deve ser sempre amplificado na ausência do DNA alvo. Quando nenhum dos DNAs (IAC e alvo) é amplificado, é sinal que a reação de PCR falhou e a amostra deve ser analisada novamente.

Diversas PCRs foram desenvolvidas para detecção de salmonelas em alimentos (COHEN; MECHANDA; LIN, 1996; LIN; TSEN, 1996; CHEN et al., 1997; FACH et al., 1999; LIN; TSEN, 1999; FERRETTI et al., 2001; TRKOV; AVGUSTIN, 2003; CHIU et al., 2005). Entretanto, várias apresentam limitações como falhas em identificar todos os sorovares de salmonelas testados e produção de bandas

múltiplas inespecíficas ou bandas de tamanho esperado com o DNA de outras bactérias (GOODING; CHOUDARY, 1999, MALORNY et al, 2003, ZIEMER; STEADHAM, 2003). Além disso, devido a variações no desempenho de termocicladores, na eficiência de diferentes DNA polimerases, do pessoal envolvido e devido à presença de inibidores da PCR, muitas vezes outros laboratórios não conseguem reproduzi-las e implementá-las. Outra limitação da maioria das PCRs publicadas é que estas não apresentam um IAC. Segundo o guia geral para desenvolvimento de PCRs para detecção de patógenos de origem alimentar, proposto pelo Comitê Europeu de Padronização (CEN) em colaboração com a Organização Internacional de Padrões (ISO), a presença de um IAC nas reações é necessária e é um pré-requisito para validação de PCRs (ANONYMOUS, 2002). “Kits” de PCR também estão disponíveis comercialmente em nosso país, porém também são importados e apresentam um custo muito elevado.

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver métodos rápidos para detecção de salmonelas em alimentos, baseados na reação antígeno-anticorpo (métodos imunológicos) e na reação de amplificação de DNA (método molecular). Inicialmente, para o desenvolvimento dos métodos imunológicos, anticorpos monoclonais específicos para salmonelas do sorogrupo B foram produzidos e caracterizados. Os anticorpos produzidos foram utilizados como anticorpos de captura e detecção em um ELISA sanduíche específico para identificação de *Salmonella* Typhimurium em carnes. Os resultados destes experimentos são mostrados no Trabalho 1. A seguir, no Trabalho 2, são mostrados os resultados dos experimentos de desenvolvimento de uma PCR e de um protocolo de separação imunomagnética (IMS) para serem usados em associação. Para o protocolo da IMS, inicialmente, um anticorpo monoclonal foi ligado a microesferas magnéticas. Para o desenvolvimento do método molecular PCR, uma seqüência de nucleotídeos específica de salmonelas (gene *fimA*) foi selecionada, *primers* foram desenhados e um controle interno de amplificação foi desenvolvido. A PCR foi avaliada quanto à sensibilidade e especificidade e ao limite de detecção com DNA puro. A seguir, tanto a PCR usada isoladamente como associada à IMS foram avaliadas quanto ao número mínimo de salmonelas necessários para obtenção de uma reação positiva (limite de detecção), e quanto a influência da microbiota natural presente nos alimentos. Para fins comparativos, todas as amostras foram também analisadas pela metodologia convencional de cultivo.

## **2. TRABALHO Nº 01**

### **MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST SEROGROUP B SALMONELLAE: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND USE IN A SANDWICH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY**

# MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST SEROGROUP B SALMONELLAE: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND USE IN A SANDWICH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

## ABSTRACT

Ten monoclonal antibodies (MAbs) specific to serogroup B salmonellae were obtained after immunization of BALB/c mice with outer membrane proteins (OMPs) from *Salmonella* Typhimurium. MAbs isotyping revealed that seven were of the isotype IgG<sub>3</sub>, one belonged to the IgG<sub>2b</sub> isotype, one to the IgM isotype and another to the IgA isotype. Affinity constants measured by ELISA ranged from  $8 \times 10^5$  to  $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Results of additivity ELISA demonstrate that most MAbs recognize different epitopes. ELISA and immunoblotting were used to determine antigen specificity of MAbs. The MAbs were more reactive with live *S. Typhimurium* than with heat-treated bacterial cells and proved to be a useful reagent for developing immunoassays for the detection of *S. Typhimurium*. Two MAbs were used for the development of a sandwich ELISA for detection of *S. Typhimurium* in meat. The detection limit of the sandwich ELISA was  $10^5$  CFU/ml and it was able to detect 1-10 CFU of *S. Typhimurium* in post-enrichment broth from 25 g of beef and chicken meat samples contaminated with natural flora. The total time of the assay was 57 h.

## INTRODUCTION

Non-typhoidal salmonellae cause gastroenteritis, an infectious disease usually self-limiting in the healthy human population, characterized by diarrhea, abdominal cramps, vomiting and fever, and may cause a more invasive, life-threatening infection (bacteremia) in immunocompromised patients (LEVINE et al., 1991), in children, especially those under 1 year of age, and in the elderly (DARWIN & MILLER, 1999). Moreover, strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium resistant to multiple antibiotics have emerged, making outbreaks caused by this pathogen even more dangerous. This serotype and others of serogroup B (*S. Heidelberg*, *S. Agona*, *S. Saint Paul*, *S. Derby* and *S. Paratyphi B*) were among the 20 most commonly isolated serotypes from humans in the United States during 1973-1996 (CDCa,1996; CDCb, 1996). Also, a recent report includes *S. Typhimurium* and

*S. Heidelberg* among the serotypes most commonly involved in outbreaks of foodborne infections (CDC, 2004).

Conventional methods for detection of *Salmonella* in foods are laborious and time-consuming (4 to 6 days to perform), requiring nonselective pre-enrichment, selective enrichment, plating on differential agar media, presumptive biochemical identification and serological confirmation. Many novel rapid methods for *Salmonella* detection are being developed in an effort to replace traditional techniques, but these methods often suffer from a lack of sensitivity or specificity or require expensive equipment or a high degree of technical expertise to perform (BLACKBURN, 1993; SWAMINATHAN & FENG, 1994; PELOW et al., 1999).

Immunoassays are methods used for the rapid detection of foodborne pathogens. They are easy to use, specific for the target host, and can reduce detection time to 2-3 days (ANDREWS, 1985; VARADARAJ, 1993). Monoclonal antibodies (MAbs), which have been raised against lipopolysaccharides, flagellar proteins, outer membrane proteins (OMPs) and other cellular components, are a versatile tool that help detection of food-borne pathogens by immunoassays and increase their specificity. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using both polyclonal and monoclonal antibodies, show high reproducibility and possibility for simultaneously conducting a large number of assays (PADHYE & DOYLE, 1991; FELDSINE et al., 1997).

ELISA for detection of *Salmonella* have been established (LEE et al., 1990; KERR et al., 1992; WYATT et al., 1993; NG et al., 1996; VALDIVIESO-GARCIA et al., 2001), but few attempts have been made to develop ELISA for specific detection of *S. Typhimurium* and other bacteria of the serogroup B. One of these attempts was the ELISA developed by Lee et al. (1990) wherein the detector MAb used reacts only with *S. Typhimurium* and *S. Agona*, and a rabbit polyclonal antiserum and an anti-mouse immunoglobulin M-peroxidase labeled antibody were used to coat the plate and to detect the MAb, respectively.

This paper describes the production and characterization of MAbs specific for an OMP of serogroup B salmonellae and their use in a sandwich ELISA for rapid detection of *S. Typhimurium* in experimentally contaminated beef and chicken meat.

## MATERIAL AND METHODS

### 1. Bacteria and growth conditions

*Salmonella* strains of different serotypes and other bacteria used in this study were obtained from the culture collection of Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil). Stock cultures were maintained lyophilized and were grown overnight on brain heart infusion (BHI) broth at 37°C with gentle shaking. *S. Typhimurium* was used for preparation of the antigen for immunization of mice. Additional bacteria were used to characterize MAbs specificity in an indirect ELISA. Unless otherwise stated cell suspensions were heat-treated (10 min, 100°C) and diluted to OD 0.9 at 600 nm with 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) for use in ELISA. All bacterial species used in this study are shown in Table 1.

### 2. Preparation of the immunizing antigen

OMPs were prepared according the method described by Filip et al. (1973). Briefly, *S. Typhimurium* was cultured for 24 h in 2 l of BHI broth at 37°C with constant agitation (150 rpm). Cells were harvested by centrifugation (15,000 g, 15 min, 4°C), washed with saline (0.85% NaCl), resuspended in 10 ml of 10 mM Tris-HCl - 5 mM EDTA buffer (pH 7.8) and sonicated ten times at 60 Hz for 30 seconds. Cell debris were removed by centrifugation (15,000 g, 30 min, 4°C) and 2.5 ml of 10 mM Tris-HCl buffer with n-laurilsarcosine 2% was added to supernatant. After 30 min at room temperature, OMPs were separated from the supernatant by ultracentrifugation (300,000 g, 1 h, 4°C), resuspended in 5 ml of 10 mM Tris-HCl buffer, mixed with 5 ml of 10 mM Tris-HCl buffer with n-laurilsarcosine 2% and again ultracentrifuged. The pellet was washed with saline, resuspended in 5 ml of 10 mM Tris-HCl buffer, dialysed against saline and stored at -20°C. The protein concentration was determined by the Bradford method (BRADFORD, 1976) and the profile of OMPs was visualized by SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). This OMP preparation was used for immunization of mouse for hybridoma production and as antigen in indirect ELISA and immunoblotting.

### 3. Immunization of mice

BALB/c mice (6 to 8 weeks old) were injected intraperitoneally with 100 µg of the *S. Typhimurium* OMP preparation diluted in 0.25 ml of saline and emulsified with

an equal volume of complete Freund adjuvant. Following immunizations were similar to the first one, except that incomplete Freund adjuvant was used. The mice received boost injections after 2 and 3 weeks. One week after the third injection the mice were bled from the retroorbital venous plexus, sera were separated and antibody titers determined by indirect ELISA. Mouse expressing the highest serum titer was boosted intravenously and intraperitoneally.

#### **4. Production of MAbs**

Four days after the last injection the mouse was sacrificed by cervical dislocation, the spleen was removed aseptically and the spleen cells were fused with myeloma cells. The fusion was performed essentially as described by Harlow & Lane (1988). Briefly, spleen cells from immunized mouse were harvested and fused with Sp2/0-Ag-14 myeloma cells at a ratio of 10:1 in serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO) by using 50% polyethylene glycol (MW 1,300 to 1,600) as fusing agent. The hybridomas were grown in 96-well plates in DMEM supplemented with hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) and 20% of fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP) at 37°C under 7% CO<sub>2</sub>. Two weeks after fusion, an indirect ELISA was used to screen supernatants from wells with hybridoma growth for production of antibodies against OMP antigens from *S. Typhimurium*. Hybridomas producing specific antibodies were cloned at least twice by the limiting-dilution method and reassayed for antibody production. Once established, the hybridoma lines were expanded in tissue culture flasks and frozen in liquid N<sub>2</sub> for future use or propagated in mice to obtain ascitic fluid.

#### **5. Production of ascitic fluid**

To obtain high yields of antibodies, the hybridomas were grown as ascitic tumors in BALB/c mice primed with pristane (2,6,10,14-tetramethyl pentadecane) (Sigma). Pristane (0.5 ml per mouse) was injected intraperitoneally into BALB/c mice at 6 to 8 weeks of age. Ten days later, mice were injected with  $0.25 - 1,25 \times 10^6$  hybridoma cells in 0.5 ml of serum-free DMEM medium by the intraperitoneal route. The ascitic fluid was collected 7 to 14 days after injection of the hybridoma cells. Cell debris and fibrin clots were removed by centrifugation (4,000 g, 10 min) and the antibody containing clarified ascitic fluids were stored at -20°C.

## 6. Isotyping and purification of MAbs

MAb classes and subclasses were determined with a mouse monoclonal isotyping kit that was used according to the manufacturer's instructions (Sigma). IgG MAbs from ascitic fluid were purified by affinity chromatography with protein A Sepharose 4B. MAbs were dialyzed against 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) overnight at 4°C. Protein concentrations were determined by the Bradford method and the activity of purified MAbs was determined by indirect ELISA. The purity of MAbs was confirmed by SDS-PAGE.

## 7. Indirect ELISA

Screening of sera from immunized mice, of supernatants from wells with hybridoma growth and of ascites for the presence of antibodies against OMP antigens was performed by indirect ELISA in polystyrene 96 well microtitre plates (Polysorp, Nunc). Plate wells were coated with 25 µg/ml of purified OMP of *S. Typhimurium* diluted in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. Plates were incubated at 4°C overnight and washed 3 times with PBS, pH 7.2 containing 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) to remove unbound antigens. Diluted sera, supernatants from spent cultures or diluted ascitic fluid were added to wells and plates were incubated for 1 h at 37°C. Negative control wells were prepared with HAT-DMEM medium and normal mouse serum, and positive control with post-immunization serum from the mouse used in fusion. After another series of 3 washes, goat anti-mouse Ig-peroxidase conjugated antibody (Sigma) at 1:2,000 dilution was added and incubated as above. Excess conjugate was removed by washing five times with PBST and the solution of enzyme substrate/ chromogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ ortophenylenodiamine) in citrate-phosphate buffer pH 5.0 was added. The reaction was allowed to take place in the dark for 10 minutes and optical density read at 450 nm in an automated ELISA reader (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments, Huntsville, AL). All reagents were used at 100 µl/well volumes.

Additional indirect ELISAs were performed as described above with different purposes. For the investigation of MAbs specificities, plates were coated with heat-treated (100°C/10 min) suspensions of whole bacterial cells from *Salmonella* strains of different serovars and from other bacterial species. For the determination of titration curves, MAb concentrations were first adjusted to 250 µg/ml, diluted two-fold

with PBST and added to wells of ELISA plates coated with purified *S. Typhimurium* OMP (7.5  $\mu\text{g/ml}$ ). To investigate the ability of reacting with native OMP antigen, plates were coated with heat-treated and live bacterial cells ( $10^9$  cells/ml) diluted in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). Positive and negative control wells were prepared with post immunization serum from the mouse used in fusion and PBST, respectively.

## 8. Immunoblotting

Whole-cell antigens from different bacteria and purified OMP from *S. Typhimurium* were loaded onto discontinuous SDS-polyacrylamide (5% stacking and 12% separating) gels and were separated by SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). After electrophoresis, the antigens were transferred electrophoretically from the SDS-PAGE gel to a nitrocellulose membrane (TOWBIN et al., 1979) and free binding sites were blocked with 5% (w/v) skimmed milk suspended in PBS. The membrane was washed with PBST and incubated with the various MAbs for 1 h at 37°C. After washing, the membrane was incubated with a goat anti-mouse Ig-peroxidase conjugate (1:2,000; Sigma). Bands were visualized after the addition of 4-chloro-1-naphtol (Sigma) as substrate and color development was stopped with distilled water.

## 9. Affinity constants of MAbs

The affinity constants ( $K_{\text{aff}}$ ) of MAbs for their antigens were determined by the ELISA method (FRIGUET et al., 1985), with modifications. Briefly, concentrations of the antigen varying from  $1.3 \times 10^{-9}$  M to  $1.45 \times 10^{-7}$  M were incubated in solution with known amounts of each MAb until equilibrium was reached (24 h at 20°C). After incubation, unbound antibodies in the liquid phase were determined by indirect ELISA. This ELISA used *S. Typhimurium* OMP (1  $\mu\text{g/mL}$ ) for coating wells of microtitre plates and goat anti-mouse Ig-peroxidase conjugated antibody for detecting bound MAb. The optical densities (OD) were read at 450 nm and histograms were built according Bobrovnik (2003). The linear relationships between values  $(A_0 - A_i)/A_i$  and  $I_i$  (where  $A_0$  is the OD of each MAb without reacting with antigen,  $A_i$  is the OD of each MAb after reacting with each antigen concentration and  $I_i$  is the variable concentration of antigen) were determined and the values of  $K_{\text{aff}}$  were defined by measuring the slope of these linear relationships.

## 10. Additivity ELISA

The additivity ELISA was performed according to Friguet et al. (1983), with modifications. First, an indirect ELISA was used to determine saturation curves of the antigen (*S. Typhimurium* OMP; 7.5 µg/mL) with each MAb. Then, paired MAbs and each MAb alone were added at saturation levels to the wells of polystyrene 96 well microtitre plates and the amount of bound antibody was tested by adding goat anti-mouse Ig-peroxidase conjugated antibody. An additivity index for each pair of MAbs was calculated according to the formula  $\{[2 A_{1+2}/(A_1 + A_2)] - 1\} \times 100$ , where  $A_1$ ,  $A_2$ , and  $A_{1+2}$  are absorbance values with antibody 1 alone, antibody 2 alone, and the two antibodies together, respectively.

## 11. Sandwich ELISA

For the development of the sandwich ELISA, MAb 46D3 was used as detection antibody and MAb 212E3 or rabbit IgG, purified from commercially available anti-salmonellae somatic polyvalent rabbit sera, were used separately as capture antibodies to determine which combination would yield the most sensitive format for detecting *S. Typhimurium*. Wells of polystyrene microtitre plates were coated at 4°C overnight with two-fold dilutions of each antibody in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6. Purified *S. Typhimurium* OMP (7.5 µg/ml) or a *S. Typhimurium* culture ( $10^9$  CFU/ml) was added to each well and the plates were incubated for 1 h at 37°C. After washing three times with PBST, a 1:2,000 dilution of MAb 46D3 conjugated to peroxidase by the periodate method (WILSON & NAKANE, 1978) was added and the incubation repeated. Excess conjugate was removed by washing five times with PBST, the solution of substrate/chromogen was added, the reaction was allowed to proceed in the dark for 10 minutes and optical densities were read at 450 nm in the ELISA reader. The reagents were used at 100 µl/well volumes.

For the investigation of the detection limit of the sandwich ELISA, a culture of *S. Typhimurium* in the logarithmic growth phase was heat treated (10 min, 100°C), serially ten-fold diluted with PBST and added to wells coated with capture antibody. For detection of *S. Typhimurium* from experimentally contaminated meat, samples containing different numbers of the bacterium were conventionally enriched, post-enriched for 6 h in BHI broth, heated at 100°C for 10 min and added to the wells coated with capture antibody. Other sandwich ELISA steps were as described above.

## 12. Contamination of food samples

Samples of 25 g of beef and chicken meat obtained from local retail suppliers were contaminated with 0.1 ml of 0.1% peptone water containing approximately  $1-10$ ,  $10-10^2$  and  $10^2-10^3$  CFU of *S. Typhimurium*. The actual numbers of cells inoculated were determined by viable cell plate counts. The samples were pre-enriched in buffered peptoned water (BPW) for 24 h at 37° C, enriched in tetrathionate (TT) and Rappaport-Vassiliadis (RV) broth for 24 h at 42° C and post-enriched in BHI broth for 6 h at 37° C before sandwich ELISA. All samples were also analyzed by conventional methodology (BAM/FDA, 1998).

## RESULTS

Ten hybridomas secreting antibodies that react with an OMP antigen of *S. Typhimurium* were obtained from two separate fusions. The hybridomas were cloned twice and propagated in mice to obtain ascitic fluid. The MAbs obtained from ascitic fluids were purified and further characterized. Purity of MAb preparations was confirmed by SDS-PAGE and specificity was determined by indirect ELISA which used heat-extracted (100° C/10 min) antigens from various bacteria, including *Salmonella* strains of different serovars. MAbs were found to react more strong only to serovars belonging to serogroup B (*S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* and *S. Saint Paul*) and failed to bind to representative strains of other serogroups of salmonellae and of other bacteria (Table 1).

**Table 1.** MAb specificity determined by indirect ELISA with different *Salmonella* serovars and other bacteria<sup>a</sup>.

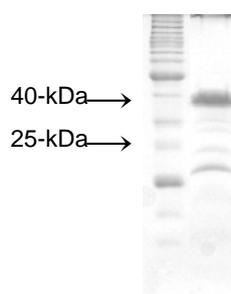
Species (Serogroup)	Serovar	OD <sub>450</sub>							
		MAb <sup>b</sup> 46D3	MAb 36C3	MAb 22B3	MAb 18A3	MAb 49E3	MAb 411C3	MAb 212E3	MAb 410G3
<i>Salmonella</i>									
A	S. Paratyphi	0.015 <sup>c</sup>	0.009	0.016	0.011	0.011	0.029	0.000	0.010
B	S. Agona	0.017	0.010	0.019	0.009	0.004	0.015	0.000	0.012
	S. Derby	0.016	0.052	0.020	0.011	0.003	0.021	0.028	0.021
	S. Typhimurium	0.169	0.165	0.168	0.130	0.127	0.251	0.157	0.156
	S. Heidelberg	0.246	0.171	0.176	0.203	0.190	0.357	0.164	0.163
	S. Saint Paul	0.286	0.203	0.218	0.292	0.292	0.364	0.155	0.153
C1	S. Oranienberg	0.013	0.007	0.018	0.007	0.001	0.014	0.008	0.008
	S. Choleraesuis	0.021	0.011	0.025	0.012	0.004	0.018	0.005	0.011
C2	S. Infantis	0.020	0.008	0.020	0.011	0.000	0.020	0.003	0.013
	S. Hadar	0.018	0.011	0.016	0.011	0.000	0.018	0.010	0.012
	S. Emek	0.018	0.009	0.021	0.010	0.004	0.012	0.008	0.011
C3	S. Albany	0.019	0.013	0.030	0.008	0.012	0.025	0.003	0.011
D1	S. Enteritidis	0.016	0.010	0.020	0.011	0.002	0.011	0.009	0.011
	S. Gallinarum	0.019	0.014	0.018	0.010	0.004	0.017	0.012	0.010
	S. Dublin	0.017	0.010	0.016	0.007	0.005	0.014	0.004	0.011
E1	S. Anatum	0.018	0.011	0.022	0.011	0.005	0.016	0.005	0.013
E2	S. Newington	0.013	0.013	0.032	0.014	0.001	0.035	0.005	0.012
E4	S. Senftenberg	0.022	0.005	0.020	0.009	0.000	0.013	0.011	0.015
F	S. Rubislaw	0.019	0.010	0.015	0.010	0.000	0.013	0.007	0.012
G	S. Worthington	0.014	0.008	0.013	0.006	0.000	0.011	0.011	0.005
H	S. Florida	0.026	0.008	0.018	0.013	0.004	0.016	0.008	0.011
	<i>Proteus vulgaris</i>	0.022	0.008	0.020	0.010	0.008	0.029	0.004	0.016
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.014	0.006	0.016	0.015	0.004	0.014	0.003	0.019
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.015	0.010	0.018	0.015	0.002	0.029	0.007	0.009
	<i>Serratia marcescens</i>	0.016	0.010	0.012	0.001	0.001	0.008	0.009	0.010
	<i>Citrobacter freundii</i>	0.014	0.010	0.020	0.013	0.008	0.017	0.008	0.018
	<i>Escherichia coli</i>	0.025	0.012	0.031	0.013	0.012	0.029	0.010	0.016
	<i>Shigella sonnei</i>	0.014	0.011	0.013	0.012	0.000	0.015	0.003	0.006
	<i>Edwardsiella tarda</i>	0.017	0.009	0.015	0.010	0.000	0.010	0.008	0.012
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.016	0.012	0.026	0.012	0.003	0.032	0.006	0.006

<sup>a</sup> Cell suspensions heat treated (100°C/10 min) and diluted to OD 0.9 at 600 nm with 0.05 M carbonate bicarbonate buffer (pH 9.6) were used as coating antigen in indirect ELISA.

<sup>b</sup> MAbs purified from ascitic fluids by protein A affinity chromatography and used at 5 µg/ml.

<sup>c</sup> Mean of three replicates.

The protein profile of the *S. Typhimurium* OMP preparation, revealed by Coomassie brilliant blue staining after SDS-PAGE, included one major band with molecular mass of about 38 kDa and other band of about 22 kDa (Figure 1). The proteins were transferred from gel to a nitrocellulose membrane, and the localization of the antigen recognized by the MAbs was determined by immunoblotting. All ten MAbs were specific for the OMP 38 kDa protein band of *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* and *S. Saint Paul* (data not shown).



**Figure 1.** SDS-PAGE profile of a preparation of OMP from *S. Typhimurium*. Lane 1, molecular weight markers; lane 2, OMP. The gel was stained with Coomassie brilliant blue.

Table 2 shows the results of MAbs characterization. Isotyping revealed that seven MAbs were of the IgG<sub>3</sub> isotype, one belonged to the IgG<sub>2b</sub> isotype, one to the IgM isotype and another to the IgA isotype. The affinity of MAbs for the epitopes in the 38 kDa OMP antigen was determined by indirect ELISA. The affinity constant ranged from  $8 \times 10^5$  to  $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , and MAbs with the highest affinities were 46D3, 411C3, 49E3 and 36C3. The titers ranged from 250 to 4,000, and the highest titers were given by MAb 46D3 followed by MAbs 411C3 and 22B3. Titration curves of MAb preparations (250  $\mu\text{g/ml}$ ) are shown in the Figure 2.

**Table 2.** Characterization of MAbs produced against OMP antigens from *S. Typhimurium*.

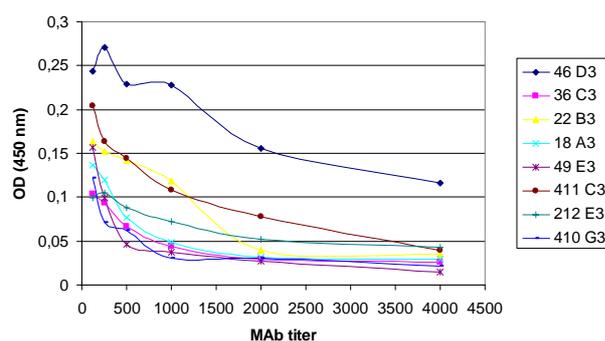
MAb <sup>a</sup>	Isotype	ELISA titre <sup>b</sup>	Affinity constant ( $\text{M}^{-1}$ )	Reaction on immunoblotting <sup>c</sup>
46D3	IgG <sub>2b</sub>	4,000	$1 \times 10^7$	+
36C3	IgG <sub>3</sub>	250	$2 \times 10^7$	+
22B3	IgG <sub>3</sub>	1,000	$5 \times 10^6$	+
18A3	IgG <sub>3</sub>	250	$5 \times 10^6$	+
49E3	IgG <sub>3</sub>	250	$6 \times 10^7$	+
411C3	IgG <sub>3</sub>	1,000	$1 \times 10^7$	+
212E3	IgG <sub>3</sub>	250	$8 \times 10^5$	+
410G3	IgG <sub>3</sub>	250	$2 \times 10^6$	+
210C3	IgM	ND <sup>d</sup>	ND	ND
135B2	IgA	ND	ND	ND

<sup>a</sup> IgG MAbs purified from ascitic fluid by protein A affinity chromatography.

<sup>b</sup> Titre expressed as reciprocal of last dilution showing OD higher or equal to 0.100 in indirect ELISA using OMP from *S. Typhimurium* as coating antigen; concentration of antibody preparations was 250  $\mu\text{g/ml}$ .

<sup>c</sup> Reaction with a 38 kDa band from OMP preparation.

<sup>d</sup> Not done.



**Figure 2.** Titration curves of MAb preparations with protein concentrations adjusted to 250 µg/ml. The MAbs were two-fold diluted with PBST and added to ELISA plates coated with purified *S. Typhimurium* OMP (7.5 µg/ml). Each point represents the mean OD (450 nm) of triplicate wells.

The ability of MAbs to react with native OMP from *S. Typhimurium* was evaluated by indirect ELISA using heat-treated and live bacterial cells as antigens. The MAbs reacted strongly with live than with heat-treated bacterial cells (data not shown).

An additivity ELISA was used to investigate MAbs recognition of antigenic sites. In this assay, an additivity index is calculated for each pair of MAbs competing for epitopes in the antigen molecule fixed in ELISA plates. Low indexes suggest binding to the same epitope. Results indicate that most MAbs recognize sites that are sufficiently apart from each other so that effects of esteric hindrance are minimal (Table 3). However, binding of MAb 46D3 was affected by the binding of all other MAbs but 212E3.

**Table 3.** Recognition of antigenic sites by MAbs determined by additivity ELISA<sup>a</sup>.

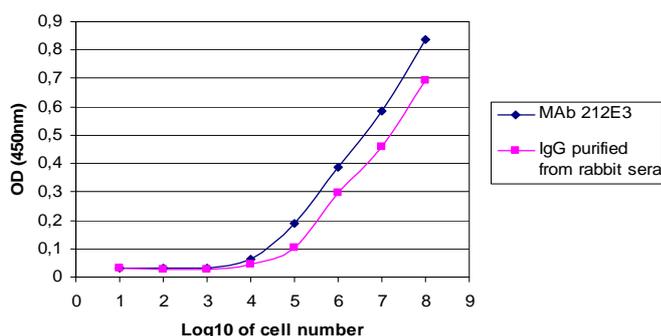
MAb <sup>b</sup>	Additivity index							
	46D3	36C3	22B3	18A3	49E3	411C3	212E3	410G3
46D3	-	0.26	0.60	0.10	0.26	7.79	64.33	39.49
36C3	0.26 <sup>c</sup>	-	63.41	48.61	33.04	93.81	65.92	45.04
22B3	0.60	63.41	-	43.26	42.08	67.41	84.90	65.15
18A3	0.10	48.61	43.26	-	35.65	25.32	70.07	49.51
49E3	0.26	33.04	42.08	35.65	-	22.15	75.92	90.74
411C3	7.79	93.81	67.41	25.32	22.15	-	99.15	98.84
212E3	64.33	65.92	84.90	70.07	75.92	99.15	-	13.66
410G3	39.49	45.04	65.15	49.51	90.74	98.84	13.66	-

<sup>a</sup> Paired MAbs and each MAb alone were added at saturation levels to wells of microtitre plates coated with *S. Typhimurium* OMP (7.5 µg/mL) and the amount of bound antibody was tested by adding goat anti-mouse Ig-peroxidase conjugated antibody.

<sup>b</sup> MAbs purified from ascitic fluid by protein A affinity chromatography.

<sup>c</sup> The additivity index for each pair of MAbs is shown in % and was calculated according to the formula  $\{[2 A_{1+2}/(A_1 + A_2)] - 1\} \times 100$ , where  $A_1$ ,  $A_2$ , and  $A_{1+2}$  are absorbance values with antibody 1 alone, antibody 2 alone, and the two antibodies together, respectively.

A sandwich ELISA using MAb 46D-peroxidase conjugate as probe for detection of *S. Typhimurium* in beef and chicken meat was developed. First, MAb 212E3 and IgG purified from anti-salmonellae somatic polyvalent rabbit sera were tested as capture antibodies, at different concentrations, to determine which one would yield the most sensitive assay for detecting the bacterium. The best result was obtained with MAb 212E3 at 10 µg/ml, which was able to detect 10<sup>5</sup> CFU/mL (Figure 4). This sandwich ELISA was then used for detection of *S. Typhimurium* in experimentally contaminated meat samples. Different samples (25 g) of beef and chicken meat containing between 1-10, 10-10<sup>2</sup> and 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> *S. Typhimurium* cells were pre-enriched in buffered peptone water (BPW) for 24 h at 37° C, selectively enriched in tetrathionate (TT) and Rappaport-Vassiliadis (RV) broth for 24 h at 42° C, post-enriched in BHI broth for 6 h at 37° C, heated at 100° C for 10 min and used in the sandwich ELISA. The sandwich ELISA was able to detect *S. Typhimurium* in the three levels of contamination tested (Table 4).



**Figure 4.** Detection limit of *S. Typhimurium* by sandwich ELISA. Cell suspension was heat treated (100°C/10 min), serially ten-fold diluted with PBST and added to wells coated with capture antibodies. Detection limit expressed as the first cell number showing OD higher or equal to 0.100 in sandwich ELISA.

**Table 4.** Comparison of sandwich ELISA and conventional methodology for detection of *S. Typhimurium* in experimentally contaminated meat samples.

Meat sample	Inoculum (CFU/25g)	Sandwich ELISA <sup>a</sup>	Conventional methodology
Beef	1-10	+ <sup>b</sup>	+
	10-10 <sup>2</sup>	+	+
	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	+	+
Chicken	1-10	+	+
	10-10 <sup>2</sup>	+	+
	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	+	+

<sup>a</sup> sandwich ELISA using MAb 212E3 as capture antibody.

<sup>b</sup> Positive result.

## DISCUSSION

Specific and sensitive immunoassays for rapid detection of *S. Typhimurium* and other serovars belonging to serogroup B in foods and feeds are necessary since they are one of the most common causes of acute gastroenteritis in humans and farm animals (MITOV et al., 2003). Moreover, strains of *S. Typhimurium* resistant to multiple antibiotics have emerged and spread within populations of food animals (RABSCH et al., 2001). This paper describes the production of 10 MAbs reactive with an OMP antigen of 38 kDa from *S. Typhimurium* that could be useful for the development of specific detection assays. According to research in the Genbank, probably this OMP antigen is codified by *ompC* gene and is one of the major structural membrane proteins of *Salmonella*. However, indirect ELISA and immunoblotting using whole cell antigens from different *Salmonella* serovars and other bacteria have shown that these MAbs reacted only with *S. Heidelberg* and *S. Saint Paul*, besides *S. Typhimurium*. A few attempts to generate MAbs specific for *S. Typhimurium* and other serogroup B salmonellae have been made, no one against OMP antigens. MAbs were obtained against LPS antigens from these bacteria but all presented cross-reactivity with strains from other serogroups (TSANG et al., 1991; YAMAURA et al., 1992; MITOV et al., 2003). In other study, MAbs specific for phase 1 and 2 flagella of *S. Typhimurium* (H:i and H:1,2) were produced and used to confirm isolates from infected animals (de VRIES et al., 1998).

The affinity of an antibody for its corresponding antigen is a crucial parameter affecting the performance of an immunoassay such as ELISA. High-affinity antibodies can lower the detection limit of the assay, decrease assay incubation times, and lower the dissociation tendency of the antigen/antibody complex in heterogeneous assays (DESHPANDE, 1996; BROVKO et al., 2004). The ELISA method (FRIGUET et al., 1985) used to measure antibody affinity in the present study requires a small amount of antibody and antigens, and does not need purification or labeling of reagents. In this method, true affinity constants of the antigen-antibodies interactions are determined by measuring the concentration of free MAbs in solution after achieving equilibrium. All MAbs tested have shown high affinity, particularly 46D3, 411C3, 49E3 and 36C3, indicating that in this respect they are adequate for use in immunoassays.

An additional experiment was carried out to evaluate the performance of MAbs when reacting with the antigen fixed in a solid surface. MAb preparations (250 µg/ml) were two-fold diluted and tested in an indirect ELISA against the 38-kDa OMP antigen adsorbed to polystyrene microtiter plates. The highest titer was given by MAb 46D3, followed by MAbs 411C3 and 22B3, in spite of the major affinities of MAbs 36C3 and 49E3. These results are illustrative of the discrepancies that occurs when the antigen-antibody reaction take place in solution or in solid matrices, fact that has already been demonstrated by others (FRIGUET et al., 1985).

The antigenic sites in the 38-kDa OMP antigen from *S. Typhimurium* were easily accessible to all MAbs without the need of exposing them by heat treatment, as seen in indirect ELISA using heat-treated and live bacterial cells. The reaction with live bacteria has shown that the MAbs react with the 38-kDa antigen in its native form and that they are suitable for use in immunoassays such as ELISA, immunomagnetic separation and lateral flow for detection of live *S. Typhimurium* from food, feeds, and environmental samples.

Additivity indexes (AI) were calculated for pairs of MAbs to obtain information on their binding behavior. AI values close to zero suggest that the antibodies tested recognize the same or two closely associated epitopes, while a high AI value suggests the simultaneous binding of antibodies to distinct epitopes. Most pairs of MAbs have shown intermediate to high AI when tested in the additivity ELISA, except when pairing with MAb 46D3 that was the one with titer proper for use in solid phase immunoassays. Only one MAb (212E3) yielded an AI that suggests binding to an epitope distinct from that of 46D3. Hence, these two MAbs were chosen for use in the sandwich ELISA developed for detection of *S. Typhimurium* in meat samples.

In developing the sandwich ELISA, first two types of capture antibodies were tested to determine how they would affect the sensitivity of the assay. The use of either IgG purified from anti-salmonellae somatic polyvalent rabbit sera or the MAb 212E3 as capture antibodies, combined to MAb 46D3 as detection antibody, resulted in ELISA with detection limits of  $10^5$  CFU/ml. This sensitivity is similar to most sandwich ELISA proposed for detection of pathogenic bacteria in foods (LEE et al., 1990; WESTERMAN et al., 1997; KERR et al., 2001). A sandwich ELISA with a detection limit for *S. Typhimurium* ten-fold lower was achieved using biotinylated MAbs (VALDIVIESO-GARCIA et al., 2001). The reason for this improvement is likely the amplification effect resulting from reaction with streptavidin.

The ability of the sandwich ELISA was further investigated using the MAbs to detect *S. Typhimurium* in experimentally contaminated food samples (beef and chicken meat) in the presence of their natural microbial flora. MAb 212E3 was used as capture antibody because it gave a reaction stronger than rabbit IgG in the study of sensitivity. Positive results were obtained from all three contamination levels tested (1-10,  $10^{-10^2}$  and  $10^{-2-10^3}$  CFU of *S. Typhimurium*), indicating that the ELISA was able to detect 1-10 CFU of *S. Typhimurium* in 25 g of beef and chicken meat after conventional enrichment and a post-enrichment of 6 hours, giving a total assay time of 57 hours.

The results of characterization of MAbs suggest that they can be useful for immunoassays to detect *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* and *S. Saint Paul* (serogroup B salmonellae) in food specimens. The sandwich ELISA developed was shown to be highly specific and sensitive for detection of *S. Typhimurium* in meat, and in this manner it has the potential to be used as a rapid method for detection of this bacterium in other food matrixes.

## REFERENCES

- ANDREWS, W.H. A review of culture methods and their relation to rapid methods for detection of *Salmonella* in foods. **Food Technology**, vol.39, p.77-82. 1985.
- BAM/FDA. **Bacteriological Analytical Manual/ Food and Drug Administration**, 8th, Arlington: Association of Official Analytical Chemists. 1998.
- BLACKBURN, C. D. W. Rapid and alternative methods for the detection of salmonellae in foods. **Journal of Applied Bacteriology**, vol.75, p.199-214. 1993.
- BOBROVNIK, S.A. Determination of antibody affinity by ELISA. Theory. Journal of **Biochemical and Biophysical Methods**, vol.57, p.213-236. 2003.
- BRADFORD, M.A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.
- BROVKO, L., YOUNG, D., GRIFFITHS, M.W. Method for assessment of functional affinity of antibodies for live bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 58, p. 49-57. 2004.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDCa). *Salmonella* surveillance annual tabulation summary - 1996. US Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 1996.
- CDCb. Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1988-1992. **Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC Surveillance Summaries**, vol. 45, p.1-66. 1996.
- CDC. PHILIS surveillance data: *Salmonella* Annual Summaries. CDC. Atlanta, GA. [www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm). Accessed 4/2/2004.
- DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, p.405-428, 1999.

de VRIES, N., ZWAAGSTRA, K.A., HUIS IN'T VELD, J.H.J., VAN KNAPEN, F., VAN ZIJDERVELD, F.G., KUSTERS, J.G. Production of monoclonal antibodies specific for the *i* and 1,2 flagellar antigens of *Salmonella typhimurium* and characterization of their respective epitopes. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 64, n. 12, p. 5033-5038. 1998.

DESHPANDE, S.S. Enzyme Immunoassays from Concept to Product Development. Chapman & Hall, New York. 1996.

FELDSINE, P.T., FALBO-NELSON, M.T., BRUNELLE, S.L., FORGEY, R.L., Assurance enzyme immunoassay for detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in selected foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, vol. 80, p. 530-543. 1997.

FILIP, C.; FLETCHER, G.; WULFF, J.L.; EARHART, C.F. Solubilisation of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. **Journal of Bacteriology**, vol. 115, p. 717-722. 1973.

FRIGUET, B., DJAVADI-OHANIANCE, L., PAGES, J., BUSSARD, A., GOLDBERG, M. A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for testing whether monoclonal antibodies recognize the same antigenic site. Application to hybridomas specific for the  $\beta_2$ -subunit of *Escherichia coli* tryptophan synthase. **Journal of Immunological Methods**, v. 60, p. 351-358. 1983.

FRIGUET, B., CHAFFOTTE, A.F., DJAVADI-OHANIANCE, L., GOLDBERG, M.E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 77, p. 305-319. 1985.

HARLOW, E., LANE, D. Growing hybridoma. In: Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988. p. 245-283.

KERR, S., BALL, H.J., MACKIE, D.P., POLLOCK, D.A., FINLAY, D.A. Diagnostic application of monoclonal antibodies to outer membrane protein for rapid detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, p. 302-308. 1992.

KERR, P., CHART, H., FINLAY, D., POLLOCK, D.A., MACKIE, D.P., BALL, H.J. Development of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of animal and human *Escherichia coli* O157 strains. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 90, p. 543-549. 2001.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227, p. 680-685. 1970.

LEE, H.A., WYATT, G.M., BRAMHAM, S. MORGAN, M.R.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 56, p. 1541-1546. 1990.

LEVINE, W.C., BUEHLER, J.W., BEAN, N.H., TAUXE, R.V. Epidemiology of nontyphoidal *Salmonella* bacteremia during the human immunodeficiency virus epidemic. **Journal of Infectious Diseases**, vol. 164, p. 81-87. 1991.

MITOV, I., GEORGIEV, G., IVANOVA, R., PETROV, D., HARALAMBIEVA, I., IANKOV, I. Monoclonal antibody against O:5 *Salmonella* antigen cross-reacts with unidentified lipopolysaccharide epitope of *Salmonella* serogroup O:8 (C2-C3). **FEMS Microbiology Letters**, vol. 225, p. 299-304. 2003.

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

PADHYE, N.V., DOYLE, M.P. Rapid procedure for detecting enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 57, p. 2693-2698. 1991.

PEPLOW, M. O., CORREA-PRISANT, M., STEBBINS, M. E., JONES, F., DAVIES, P. Sensitivity, specificity, and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 65, p. 1055-1060. 1999.

RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A.J. Review: Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v.3, p.237-247, 2001.

SWAMINATHAN, B., FENG, P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, vol. 48, p. 401-426. 1994.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, vol. 76, p. 4350-4354. 1979.

TSANG, R. S. W., CHAN, K. H., LAU, N. W. H., CHOI, D. K. W., LAW, D. K. S., NG, M. H. Characterization of murine monoclonal antibodies against serogroup B *Salmonella* and application as serotyping reagent. 1991. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 29, p. 1899-1903. 1991.

VALDIVIESO-GARCIA, A., RICHE, E., ABUBAKAR, O., WADDELL, T.E., BROOKS, B.W. A double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella* using biotinylated monoclonal antibodies. **Journal of Food Protection**, vol. 64, n. 8, p. 1166-1171. 2001.

VARADARAJ, M.C. Methods for detection and enumeration of foodborne bacterial pathogens: a critical evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, vol. 30, p. 1-13, 1993.

WESTERMAN, R.B., HE, Y., KEEN, J.E., LITLEDIKE, E.T., KWANG, J. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157. **Journal of Clinical Microbiology**, vol.35, p.679-684. 1997.

WILSON, M.B., NAKANE, P.K. In: Immunofluorescence and Related Techniques. Amsterdam: Elsevier, 1978. p. 236.

WYATT, G.M., LANGLEY, M.N., LEE, H.A., MORGAN, M.R.A. Further Studies on the feasibility of one-day *Salmonella* detection by Enzyme-linked immunosorbent assay. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.59, n.5, p.1383-1390. 1993.

YAMAURA, N., UCHIYAMA, T., TERKADO, N. Production and epidemiological application of a monoclonal antibody specific for *Salmonella* O-5 antigen. **Kitasato Archives of Experimental Medicine**, vol. 65, p.13-22, 1992.

### **3. TRABALHO Nº 02**

## **DESENVOLVIMENTO DE PCR ASSOCIADA À SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* Typhimurium EM CARNES**

## DESENVOLVIMENTO DE PCR ASSOCIADA À SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA PARA DETECÇÃO DE *Salmonella* Typhimurium EM CARNES

### RESUMO

Foi desenvolvido um novo método rápido baseado em separação imunomagnética (IMS) e PCR para a detecção de *Salmonella* Typhimurium em carnes. Inicialmente, foi padronizada uma PCR com *primers* desenhados para amplificar o gene *fimA* de *Salmonella*. Com cultivos puros de *Salmonella* Typhimurium e outras bactérias, a PCR apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, e limites de detecção de  $10^4$  UFC/mL e 1,5  $\mu$ g de DNA por reação. Em seguida, foi preparado um reagente para IMS composto de microesferas magnéticas e um MAb específico para *Salmonella* Typhimurium e outras salmonelas do sorogrupo B. Este reagente foi capaz de separar e concentrar eficientemente *Salmonella* Typhimurium a partir de cultivo puro e de carnes experimentalmente contaminadas. A associação da PCR com a IMS resultou em um novo método que foi capaz de detectar cerca de 10 UFC em 25 g de carne experimentalmente contaminada e que pode ser completado em 26 horas.

### INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os principais agentes causadores de doenças de origem alimentar no mundo todo (LEWIS, 1997; OLSEN et al., 2000). A metodologia convencional para detecção de salmonelas em alimentos é trabalhosa e requer no mínimo 4 dias para obtenção de um resultado negativo e 6 a 7 dias para identificação e confirmação de amostras positivas (BAM/FDA, 1998). Este longo tempo de análise é devido ao requerimento de duas etapas de enriquecimento, uma etapa de isolamento de colônias suspeitas em ágar seletivo, e etapas adicionais para confirmações bioquímicas e sorológicas dos isolados. Esta situação fez com que, nas últimas duas décadas, houvesse um esforço importante de pesquisa e desenvolvimento de métodos rápidos de detecção (BLACKBURN, 1993; SWAMINATHAN; FENG, 1994, MANDRELL; WACHTEL, 1999). Entretanto, a maioria dos métodos que têm sido desenvolvidos apresenta problemas com a sensibilidade e especificidade ou são muito complexos.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método sensível, específico e rápido, no qual poucas cópias de DNA alvo podem ser amplificadas a um nível detectável pela eletroforese em gel. Como sua sensibilidade e especificidade dependem das seqüências dos *primers* utilizados, seqüências presentes somente nos patógenos alvos devem ser escolhidas para serem amplificadas. Diversas PCRs foram desenvolvidas para detecção de salmonelas em alimentos (COHEN; MECHANDA; LIN, 1996; LIN; TSEN, 1996; CHEN et al., 1997; FACH et al., 1999; LIN; TSEN, 1999; FERRETTI et al., 2001; TRKOV; AVGUSTIN, 2003; CHIU et al., 2005). Entretanto, várias apresentam limitações como falhas em identificar todos os sorovares de salmonelas testados e produção de bandas múltiplas inespecíficas ou bandas de tamanho esperado com o DNA de outras bactérias (GOODING; CHOUDARY, 1999, MALORNY et al., 2003, ZIEMER; STEADHAM, 2003).

A sensibilidade de uma PCR pode ser dramaticamente reduzida quando aplicada a amostras biológicas complexas, como alimentos. Isso ocorre devido à presença de diversos componentes, como proteínas, polissacarídeos, ácidos graxos e sais, e de DNA ou células de outros organismos, que inibem ou reduzem a amplificação. Por isso, a remoção dessas substâncias inibidoras e a utilização de um controle interno de amplificação (IAC) para indicar inibição, são necessárias.

A separação imunomagnética (IMS) é um método de separação e concentração de microrganismos, que tem sido aplicado para aumentar a sensibilidade e reduzir o tempo de isolamento e detecção de microrganismos específicos. Os microrganismos são capturados por microesferas magnéticas cobertas com anticorpos específicos, e são concentrados e separados através de um ímã. No caso das salmonelas, a IMS tem sido utilizada para substituir a etapa de enriquecimento seletivo (MANSFIELD; FORSYTHE, 1996), associada à ELISA (CUDJO; HAGTVEDT; DAINTY, 1995, MANSFIELD; FORSYTHE, 2001) ou PCR (RIJPENS et al., 1999, TRKOV et al., 1999, JENÍKOVÁ; PAZLAROVÁ; DEMNEROVÁ, 2000, LI; BOUDJELLAB; ZHAO, 2000, HSIH; TSEN, 2001, ŠPANOVÁ et al., 2001). Quando associada à PCR, aumenta ainda mais a sua sensibilidade, pois concentra as células alvo e as separa dos inibidores da reação e da microbiota competitiva (ŠPANOVÁ et al., 2003).

Neste trabalho, é descrito o desenvolvimento de protocolos de PCR e de IMS para serem utilizados em associação na detecção de *Salmonella* Typhimurium em carnes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Bactérias, condições de cultivo e extração de DNA

Salmonelas e outras bactérias utilizadas neste trabalho foram obtidas da coleção de culturas da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) e são listadas na Tabela 1. Culturas estoques das bactérias foram mantidas liofilizadas até o momento do uso. Para os experimentos, as bactérias foram cultivadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) a 37° C com agitação constante (150 rpm) e a densidade celular dos cultivos foi ajustada a um valor de absorbância de 0,9 a 600 nm. Para determinar o número de células viáveis utilizadas nos experimentos, diluições decimais dos cultivos foram semeadas em placas contendo ágar padrão para contagem em placas (PCA), as placas foram incubadas a 37° C por 24 h e as contagens registradas como unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

A extração de DNA genômico de 1 mL dos cultivos puros das bactérias foi realizada conforme as instruções do PureGene® DNA purification kit (Gentra Systems, USA). Para a extração do DNA bacteriano a partir dos caldos de enriquecimento das amostras de carne, um mililitro foi centrifugado a 15.000 g por 8 min, as células foram lavadas com salina tamponada fosfatada estéril (PBS, pH 7,2) e o DNA foi extraído através de aquecimento a 95° C por 15 min em 20 µL de solução de lise 1:1 (0,125% SDS e 0,05M NaOH) e centrifugação a 15.000 g por 5 min.

**Tabela 1.** Bactérias utilizadas no trabalho.

Bactérias	Sorovares	Sorogrupos
<i>Salmonella enterica</i>	Paratyphi	A
	Agona	B
	Derby	B
	Typhimurium	B
	Heidelberg	B
	Saint Paul	B
	Mbandaka	C1
	Oranienberg	C1
	Choleraesuis	C1
	Infantis	C2
	Hadar	C2
	Emek	C2
	Albany	C3
	Enteritidis	D1
	Gallinarum	D1
	Dublin	D1
	Panama	D1
	Anatum	E1
	Newington	E2
	Senftenberg	E4
Rubislaw	F	
Worthington	G	
Florida	H	
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-

## 2. Seleção dos primers

Para a seleção das seqüências de nucleotídeos específicas de salmonela a serem utilizadas como *primers* na PCR, uma extensa revisão bibliográfica e pesquisas em bancos de dados de DNA (GenBank e EMBL) foram realizadas. As seqüências pré-selecionadas foram comparadas com as de salmonelas e de outras bactérias depositadas nos bancos de dados através de alinhamento com o programa BLAST N (National Center for Biotechnology Information - NCBI). O gene *fimA* de *Salmonella* Enteritidis (número de acesso no Genbank S76043) foi o selecionado para a PCR. As seqüências para os *primers* específicos para salmonelas foram selecionadas baseadas nestes alinhamentos para amplificar o gene inteiro. Os

*primers* foram desenhados e avaliados com o auxílio do software Vector-NTI, para escolher aqueles com as melhores características. A especificidade dos *primers* para o gênero *Salmonella* foi novamente checada através de alinhamentos, para assegurar que sua seqüência fosse inteiramente complementar a de salmonelas e que não apresentasse homologia com seqüências de outras bactérias. Os *primers* foram sintetizados por MWG-Biotech (Los Angeles, CA). As seqüências dos *primers* que amplificam um fragmento de 566 pb, correspondente a todo o gene *fimA* (ATG ao stop códon), estão na Tabela 2. A concentração dos reagentes e a temperatura de anelamento ideais para o par de *primers* FimA foram determinadas por PCR com gradiente de temperatura utilizando DNA purificado de *Salmonella* Enteritidis como DNA molde.

### 3. Desenvolvimento de um controle interno de amplificação (IAC)

Um fragmento de DNA criado artificialmente foi utilizado como IAC em todas as reações de PCR. O IAC foi obtido de acordo com a estratégia descrita por Sachadyn e Kur (1998) com algumas modificações, para obter um fragmento de 850 pb que é amplificado na mesma reação que o gene alvo, utilizando o mesmo par de *primers*. O DNA IAC consistiu de um fragmento de 810 pb do vetor pGAPZ $\alpha$ A (Invitrogen<sup>®</sup>, USA), flanqueado pela seqüência alvo dos *primers* FimA e foi criado através de uma PCR de 2 etapas. *Primers* quimeras, que possuem extremidades 5' com seqüências idênticas às dos *primers* FimA (seqüência em sublinhado, tab. 2) e extremidades 3' complementares a uma determinada seqüência de DNA do plasmídeo pGAPZ $\alpha$ A (seqüência em itálico, tab. 2), foram desenhados e utilizados para amplificar o DNA a partir deste vetor. As condições de amplificação foram otimizadas para obter somente um produto de 850 pb. O produto da amplificação foi purificado conforme as instruções do kit GFX<sup>™</sup> (PCR DNA and gel band purification kit, Amersham Biosciences<sup>®</sup>, UK) e utilizado como DNA molde em uma segunda amplificação com os *primers* FimA. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25  $\mu$ L e consistiu de: 25  $\mu$ mol de cada *primer*; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen<sup>®</sup>, USA); 1X tampão de PCR e 1  $\mu$ L de DNA molde. A amplificação ocorreu em termociclador modelo Master Cycle Gradient (Eppendorf<sup>®</sup>) utilizando o seguinte programa: temperatura inicial de desnaturação de 95°C por 5 min; 35 ciclos consistindo de

desnaturação por 30 s a 95°C, anelamento dos *primers* por 30 s a 60°C e extensão por 30 s a 72°C; e extensão final de 7 min a 72°C. O produto da amplificação foi purificado e clonado no plasmídeo PCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen<sup>®</sup>, USA). O DNA plasmideal foi propagado em *Escherichia coli* TOP 10, extraído conforme as instruções do kit GFX<sup>™</sup> (Micro plasmid prep kit, Amersham Biosciences<sup>®</sup>, UK) e utilizado como IAC na PCR.

A concentração do IAC, ou seja, do plasmídeo contendo o IAC (PCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>/IAC), foi estimada através de espectrofotometria, e a concentração ótima a ser utilizada na PCR foi determinada através de experimentos de titulação. Inicialmente, para determinar a menor concentração de IAC que produz uma banda visível após eletroforese em gel, diluições decimais desse plasmídeo (50 a 0,05 µg) foram utilizadas como DNA alvo em uma PCR utilizando os *primers* FimA. Após, diferentes concentrações de IAC (3, 2, 1, 0,5, 0,1 µg), próximas a definida na PCR anterior, foram amplificadas na presença de diluições decimais do DNA de *Salmonella* Enteritidis extraído com o Kit PureGene<sup>®</sup>. A concentração ótima de IAC corresponde a menor quantidade capaz de ser amplificada na ausência de DNA de salmonela e que, na sua presença, não afeta a amplificação do gene *fimA*.

**Tabela 2.** Seqüências e orientação dos *primers* utilizados e tamanhos dos produtos amplificados.

<i>Primers</i>	Orientação da seqüência (5´- 3´)	Produto amplificado (pb)
FimA for	Forward GGGGGATCCATGAAACATAAATTAATGACCT	
FimA rev	Reverse CCGAATTCTCACATGATAAAGGTGGCG	566
FimA IAC for	Forward ATGAAACATAAATTAATGACCGCAATAATAGCGGGCGGAC	
FimA IAC rev	Reverse TTTCATGATAAAGGTGGCGCAAACCCCTACCAAGATAT	850

#### 4. PCR

Um microlitro de cada DNA extraído foi utilizado como molde na amplificação por PCR. As condições da PCR, como determinação das temperaturas de anelamento e concentração ideal de *primers* e MgCl<sub>2</sub>, foram otimizadas visando à obtenção de produtos da PCR claramente visíveis, correspondentes ao gene *fimA* e ao IAC. Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL e consistiram de: 25 µmol de cada *primer*; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante; 1X tampão de PCR; 0,5 µg de IAC e 1 µL

de DNA molde. Reações com e sem DNA purificado de *Salmonella* Enteritidis foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

A amplificação dos fragmentos que correspondem ao gene *fimA* e ao IAC foi feita em termociclador modelo Master Cycle Gradient utilizando o seguinte programa: temperatura inicial de desnaturação de 95°C por 5 min; 35 ciclos consistindo de desnaturação por 30 s a 95°C, anelamento dos *primers* por 30 s a 60°C e extensão por 30 s a 72°C; e extensão final de 7 min a 72°C. A detecção dos produtos da PCR foi feita através da visualização de bandas sob luz ultra-violeta (UV) após eletroforese em gel de agarose a 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão de corrida 45 mM de ácido bórico, 45 mM de Tris-base, 1 mM de EDTA (TBE), pH 8.0. Os marcadores de peso molecular utilizados foram o ladder 100 pb e o  $\lambda$ HindIII. As reações foram consideradas positivas e negativas quando bandas de 566 e 850 pb, respectivamente, foram visualizadas sob luz UV. Quando nenhuma banda foi visualizada, considerou-se que a reação continha substâncias inibidoras.

## **5. Limite de detecção da PCR com DNA puro**

DNA genômico de *Salmonella* Enteritidis, extraído através do kit PureGene<sup>®</sup>, foi utilizado para determinar a quantidade mínima de DNA necessária para se obter uma reação positiva na PCR. A concentração de DNA foi estimada através de espectrofotometria (260 nm), o DNA diluído a diferentes concentrações (30, 15, 7,5, 3, 1,5, 0,75  $\mu$ g/ $\mu$ L) com 10 mM Tris, 1 mM EDTA (TE), pH 8,0 estéril e utilizado nas reações de PCR.

## **6. Limite de detecção da PCR com células de *Salmonella***

Um cultivo puro de *Salmonella* Typhimurium foi utilizado para determinar o limite de detecção das reações de PCR, ou seja, o número mínimo de células de salmonelas necessário para se obter uma reação positiva. Para obter concentrações de *Salmonella* Typhimurium de  $10^0$  a  $10^9$  UFC/mL, um cultivo puro, cuja densidade celular foi ajustada a uma absorbância de 0,9 a 600 nm, foi diluído em série decimal com água peptonada 0,1%. As células foram concentradas através da centrifugação (15.000 g por 8 min) de alíquotas de 1 mL de cada diluição, lavadas com PBS e ressuspendidas em 20  $\mu$ L de solução de lise para a extração de DNA. Um microlitro do DNA extraído de cada diluição foi utilizado como molde nas reações de PCR.

## **7. Sensibilidade e especificidade da PCR**

A sensibilidade e a especificidade da PCR foram determinadas através da utilização de DNA purificado de salmonelas dos diferentes sorogrupos e de outras bactérias (tab.1) como molde nas reações de amplificação contendo os *primers* FimA.

## **8. Microesferas magnéticas e anticorpo monoclonal (MAb)**

As microesferas magnéticas utilizadas no trabalho são de poliestireno, cobertas com proteína A, possuem 0,86  $\mu\text{m}$  de diâmetro e apresentam-se em suspensão com 1% de sólidos (Bangs Laboratories, USA). A utilização de microesferas cobertas com proteína A, um constituinte natural da parede celular de *Staphylococcus aureus* que possui afinidade pela fração Fc de IgG de diversas espécies, permite a fixação adequada dos anticorpos à superfície das microesferas. Assim, os dois sítios Fab do anticorpo que se ligam ao antígeno ficam livres para capturar o microrganismo alvo, no caso, as salmonelas. O MAb utilizado é específico para um antígeno de membrana externa de *Salmonella* Typhimurium e foi produzido no Laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade Federal de Pelotas de acordo com as recomendações de Harlow e Lane (1988). Pertence ao isotipo IgG2b e foi purificado a partir de fluido ascítico através de cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de proteína A-Sepharose 4B acoplada ao aparelho AKTA Prime.

## **9. Sensibilização das microesferas com o MAb**

As microesferas magnéticas cobertas com proteína A foram sensibilizadas com o MAb específico para *Salmonella* Typhimurium de acordo com as recomendações de Conceição (2004). Primeiramente, as microesferas foram ressuspendidas em uma concentração de 0,5 mg/mL, lavadas 2 vezes em tampão borato de sódio 50 mM, pH 8,2, e recuperadas através de um concentrador de microesferas magnético (MPC-S, Dynal, Oslo, Norway). Após as lavagens, um volume de tampão borato contendo 0,6 mg/mL do MAb foi adicionado às microesferas. A mistura microesferas-MAb foi incubada por 16 a 18 h com agitação constante a 4<sup>o</sup> C. Após a incubação, as microesferas sensibilizadas com o MAb foram recuperadas com o concentrador de microesferas magnético e o sobrenadante contendo MAbs não ligados foi reservado para determinação da

concentração protéica. As microesferas foram lavadas três vezes com tampão borato, ressuspendidas a 1% de sólidos em tampão de estoque (tampão borato de sódio 10 mM, pH 8,5, + 0,01 BSA + 0,05% Tween 20 + 10 mM EDTA + 0,1% NaN<sub>3</sub>) e estocadas a 4° C. A quantidade de MAb adsorvido às microesferas foi indiretamente determinada a partir da diferença entre a concentração inicial do MAb e a concentração de MAbs não-ligados às microesferas, obtidas através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 280 nm. Além disso, as microesferas sensibilizadas foram avaliadas microscopicamente para verificação de ocorrência de auto-agregação e de aglutinação com células de *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli*.

#### **10. Limites de detecção da IMS e da PCR associada à IMS**

Para determinar o número mínimo de salmonelas que a IMS é capaz de recuperar de um cultivo líquido e que a PCR associada à IMS é capaz de detectar, um cultivo puro de *Salmonella* Typhimurium em caldo BHI foi diluído em série decimal com água peptonada a 0,1% para obter concentrações entre 10<sup>0</sup> a 10<sup>9</sup> UFC/mL. Vinte microlitros das microesferas sensibilizadas foram adicionadas a três alíquotas de 1 mL de cada diluição. As alíquotas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min sob agitação constante. As salmonelas capturadas pelas microesferas foram separadas da fase líquida e concentradas durante 3 min com o concentrador de microesferas magnético. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e as microesferas foram lavadas 3 vezes com PBS contendo 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBST). Para determinação do limite de detecção da IMS, as microesferas de uma alíquota foram ressuspendidas em 20 µL de PBS, semeadas em placas de ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) e incubadas por 24 h a 37°C para observação do crescimento de colônias típicas. As microesferas da segunda alíquota foram ressuspendidas em 20 µL de solução de lise e as da terceira alíquota foram ressuspendidas em 1 mL de BHI para um pós-enriquecimento de 6 h a 37° C. Ao fim do pós-enriquecimento, foi feita uma centrifugação a 15.000 g por 8 min, o pellet foi ressuspendido em 20 µL de solução de lise e o DNA desta alíquota e da segunda foram extraídos para serem utilizados na PCR.

## 11. Desempenho da PCR associada à IMS com amostras de carne experimentalmente contaminadas

Para verificar como a microbiota natural dos alimentos afeta o desempenho da PCR associada à IMS, amostras de carnes bovina, de frangos e suína, foram experimentalmente contaminadas com *Salmonella* Typhimurium. Todas as amostras foram obtidas no comércio local e confirmadas serem negativas para salmonelas através da metodologia convencional de detecção. Amostras de 25 g foram pesadas assepticamente em sacos plásticos estéreis e diluições decimais de um cultivo puro de *Salmonella* Typhimurium (absorbância 0,9 a 280 nm) foram adicionadas para obter três níveis de contaminação, correspondendo a aproximadamente 1-10, 10-10<sup>2</sup> e 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> células. Uma amostra de 25 g de cada tipo de carne não foi contaminada para servir como controle negativo. Todas as amostras foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada tamponada (BPW) por 1 min em Stomacher.

Em cada nível de contaminação, foram testados três protocolos de enriquecimento da amostra antes de aplicar a metodologia de detecção desenvolvida. O primeiro consistiu de um pré-enriquecimento de 16-18 h em BPW a 37° C, seguindo-se a IMS e PCR; no segundo, foi feito o mesmo pré-enriquecimento do primeiro, mas com um pós-enriquecimento de 6 h em caldo BHI entre a IMS e a PCR; o terceiro consistiu de um pré-enriquecimento de 8 h em BPW, seguindo-se a IMS e um pós-enriquecimento de 16-18 h em caldo BHI a 37° C antes de aplicar a PCR. Nos três protocolos, quinze mililitros das amostras pré-enriquecidas em BPW foram centrifugados a 2.000 g por 2 min para remoção de restos de alimentos e, após, foram novamente centrifugados a 10.000 g por 8 min para deposição das células. Os “pellets” foram ressuspensos em 1 mL de PBS e a IMS foi realizada com 20 µL de microesferas sensibilizadas. As alíquotas de 1 mL contendo as microesferas foram incubadas à temperatura ambiente por 15 min sob agitação constante. As microesferas com as salmonelas capturadas foram separadas da fase líquida e concentradas durante 3 min com o concentrador de microesferas magnético. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e as microesferas foram lavadas 3 vezes com PBST. Estas microesferas foram destinadas a extração de DNA (primeiro protocolo) ou foram suspensas em 1 mL de BHI para pós-enriquecimento (segundo e terceiro protocolos).

As amostras pós-enriquecidas em BHI foram centrifugadas a 15.000 g por 10 min e os “pellets” formados, e também as microesferas do primeiro protocolo de

enriquecimento, foram ressuspensos em 20 µL de solução de lise para extração do DNA a 95° C por 15 min e utilização na PCR. Para controle da eficiência da IMS, as microesferas foram semeadas em ágar XLD para observação de colônias típicas de salmonelas após incubação a 37° C por 24 h. Para avaliar a necessidade da IMS na metodologia desenvolvida, os três protocolos de enriquecimento foram repetidos e a PCR realizada sem que houvesse IMS. Os seis protocolos de enriquecimento são listados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Protocolos de enriquecimento utilizados para detecção de *Salmonella* Typhimurium em amostras de carne experimentalmente contaminada.

Nº do Protocolo	Pré-enriquecimento <sup>a</sup> (h)	IMS <sup>b</sup>	Pós-enriquecimento <sup>c</sup> (h)	Duração (h)
1	16-18	+	-	19-21
2	16-18	+	6	25-27
3	8	+	16-18	27-29
4	16-18	-	-	19-21
5	16-18	-	6	25-27
6	8	-	16-18	27-29

<sup>a</sup> Em água peptonada tamponada (BPW) a 37° C

<sup>b</sup> Separação imunomagnética: +, com IMS; -, sem IMS

<sup>c</sup> Em caldo BHI a 37° C

## 12. Metodologia convencional

Todas as amostras de alimentos utilizadas neste estudo foram simultaneamente analisadas pela metodologia convencional de detecção. A detecção convencional de salmonelas foi realizada de acordo com a metodologia descrita no Bacteriological Analytical Manual, 8ª edição (BAM/FDA, 1998). Amostras de 25 g foram pesadas assepticamente em sacos plásticos estéreis, homogeneizadas com 225 mL de BPW por 30 s em Stomacher e incubadas a 37° C por 24 ± 2 h para a etapa de pré-enriquecimento. Para a etapa de enriquecimento seletivo, 1 e 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas foram transferidos para 9 mL de caldo tetracionato e 9,9 mL de caldo Rappaport Vassiliadis, respectivamente, e os tubos foram incubados a 42° C por 24 ± 2 h. Para isolamento de colônias típicas, as culturas enriquecidas foram semeadas em ágar XLD e em ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose e sacarose (BPLS) contendo novobiocina e as placas foram incubadas a 37° C por 24 ± 2 h. Testes bioquímicos foram realizados em colônias suspeitas de serem salmonelas em ágar tríplice açúcar e ferro (TSI), ágar lisina e ferro (LIA) e caldo uréia. As bactérias que apresentaram reações

bioquímicas características do gênero *Salmonella* foram confirmadas através dos testes de soro aglutinação em lâmina, para antígenos somáticos e, em tubo, para antígenos flagelares.

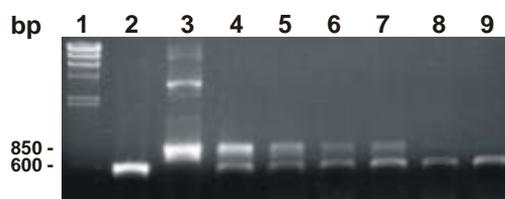
## RESULTADOS

### 1. Seleção dos *primers*

A seqüência de nucleotídeos específica de salmonelas escolhida para ser amplificada por PCR foi a do gene *fimA* de *Salmonella* Enteritidis (número de acesso no GenBank S76043). Os *primers* que amplificam um fragmento de 566 pb, correspondente ao gene *fimA* e suas seqüências são mostradas na Tabela 2. A temperatura de anelamento ideal para esse par de *primers*, para evitar ligações inespecíficas e amplificar somente a seqüência alvo foi de 60° C.

### 2. Desenvolvimento de um controle interno de amplificação (IAC)

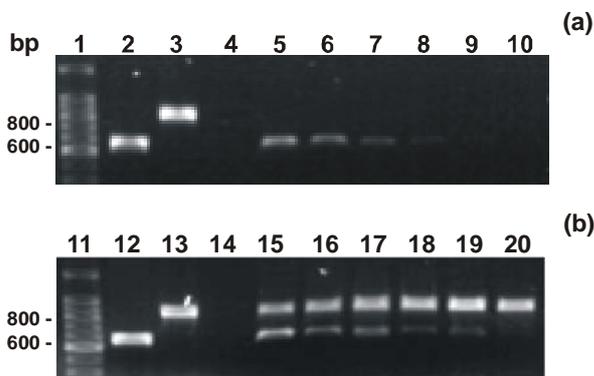
Para indicar resultados falso-negativos causados por inibidores da PCR, um IAC foi construído e clonado no plasmídeo PCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>. *Escherichia coli* TOP10 foi transformada com o PCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup>/IAC e multiplicada para extração do plasmídeo para uso como IAC. A concentração do IAC obtido foi de 500 ng/μL e a concentração ótima para a PCR, determinada por experimentos de titulação, foi de 0,5 μg/25 μL de reação (fig.1). Essa concentração de IAC não afetou o limite de detecção de salmonela da PCR, pois a intensidade das bandas dos produtos da PCR amplificados a partir de concentrações iguais de DNA de *Salmonella* Enteritidis, em presença e ausência do IAC, foram as mesmas (fig.2).



**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com os *primers* FimA, 100 μg de DNA de *Salmonella* Enteritidis (DNA SE) e diferentes concentrações do IAC. Linhas: 1, Ladder  $\lambda$ HindIII; 2, Controle positivo; 3, somente IAC; 4, DNA SE + 3 μg de IAC; 5, DNA SE + 2 μg de IAC; 6, DNA SE + 1 μg de IAC; 7, DNA SE + 0,5 μg de IAC; 8, DNA SE + 0,1 μg de IAC; 9, 100 μg de DNA SE.

### 3. Limite de detecção da PCR com DNA puro

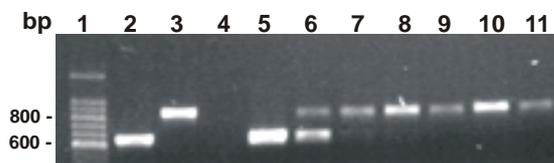
O limite de detecção da PCR com DNA puro, ou seja, a quantidade mínima de DNA necessária para se obter uma reação positiva, com e sem o IAC, foi de 1,5  $\mu\text{g}$ /25  $\mu\text{L}$  de reação e não foi afetada pela presença de 0,5  $\mu\text{g}$  de IAC (fig.2).



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com os *primers* FimA e diferentes concentrações de DNA de *Salmonella* Enteritidis. (a) sem IAC; (b) com IAC (0,5  $\mu\text{g}$ /25  $\mu\text{L}$  de reação). Linhas: 1 e 11, Ladder 100 pb; 2 e 12, Controle positivo; 3 e 13, IAC; 4 e 14, Controle negativo; 5 e 15, 30  $\mu\text{g}$  de DNA de *S. Enteritidis*; 6 e 16, 15  $\mu\text{g}$  de DNA de *S. Enteritidis*; 7 e 17, 7,5  $\mu\text{g}$  de DNA de *S. Enteritidis*; 8 e 18, 3  $\mu\text{g}$  de DNA de *S. Enteritidis*; 9 e 19, 1,5  $\mu\text{g}$  de DNA de *S. Enteritidis*; 10 e 20, 0,75  $\mu\text{g}$  de DNA de *S. Enteritidis*.

### 4. Limite de detecção da PCR com células de *Salmonella*

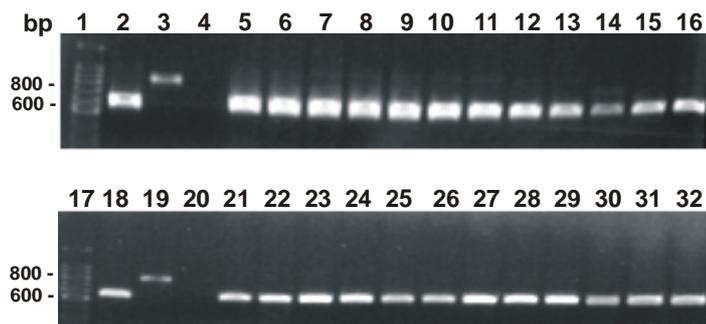
O limite de detecção da PCR com *Salmonella*, ou seja, o número mínimo de células necessário para se obter uma reação positiva, foi de  $10^4$  UFC de salmonelas por mililitro ou 500 UFC por reação (fig.3).



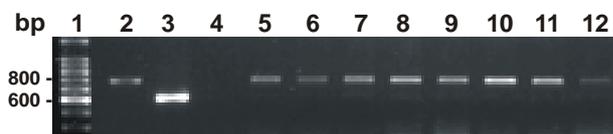
**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com os *primers* FimA e DNAs extraídos de diluições decimais de *Salmonella* Typhimurium. Linhas: 1, Ladder 100 pb; 2, Controle positivo; 3, IAC; 4, Controle negativo; 5,  $10^6$  UFC/mL; 6,  $10^5$  UFC/mL; 7,  $10^4$  UFC/mL; 8,  $10^3$  UFC/mL; 9,  $10^2$  UFC/mL; 10,  $10^1$  UFC/mL; 11,  $10^0$  UFC/mL.

### 5. Sensibilidade e especificidade da PCR

Fragmentos de aproximadamente 566 pb foram amplificados a partir do DNA de todas as salmonelas testadas (fig.4). Por outro lado, com o DNA das outras bactérias, somente houve amplificação do IAC (fig.5). Estes resultados demonstram que a PCR, que tem como alvo o gene *fimA*, apresenta sensibilidade e especificidade de 100% com cultivos bacterianos puros.



**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com os *primers* FimA e DNA de diferentes salmonelas. Linhas: 1 e 17, Ladder 100 pb; 2 e 18, Controle positivo; 3 e 19, IAC; 4 e 20, Controle negativo; 5, *S. Paratyphi*; 6, *S. Agona*; 7, *S. Derby*; 8, *S. Typhimurium*; 9, *S. Heidelberg*; 10, *S. Saint Paul*; 11, *S. Oranienberg*; 12, *S. Choleraesuis*; 13, *S. Infantis*; 14, *S. Hadar*; 15, *S. Emek*; 16, *S. Albany*; 21, *S. Enteritidis 1*; 22, *S. Gallinarum*; 23, *S. Dublin*; 24, *S. Anatum*; 25, *S. Newington*; 26, *S. Senftenberg*; 27, *S. Rubislaw*; 28, *S. Worthington*; 29, *S. Florida*; 30, *S. Panama*; 31, *S. Enteritidis 2*; 32, *S. Mbandaka*.



**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com os *primers* FimA e DNA de outras bactérias. Linhas: 1, Ladder 100 pb; 2, IAC; 3, Controle positivo; 4, Controle negativo; 5, *Proteus vulgaris*; 6, *Citrobacter freundii*; 7, *Serratia marcescens*; 8, *Enterobacter aerogenes*; 9, *Klebsiella pneumoniae*; 10, *Escherichia coli*; 11, *Shigella sonnei*; 12, *Pseudomonas aeruginosa*.

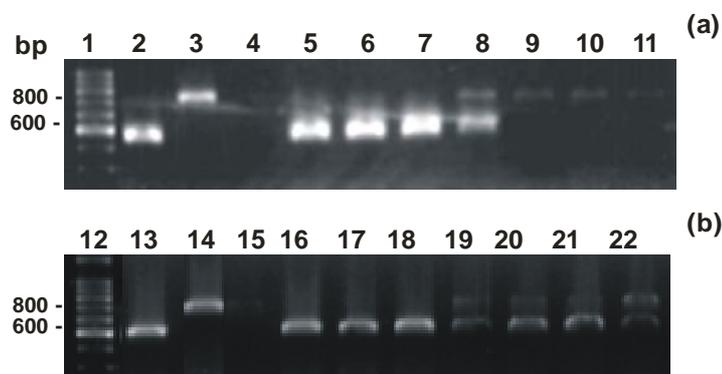
## 6. Sensibilização das microesferas com o MAb

A quantidade de MAb adsorvido em cada miligrama de microesferas foi de aproximadamente 0,7 mg, o que correspondeu a adsorção de cerca de 58% da quantidade inicial do MAb utilizado para a sensibilização. As microesferas sensibilizadas com o MAb foram avaliadas microscopicamente e mostraram pequena auto-agregação e aglutinação apenas de cultivos puros de *Salmonella Typhimurium*.

## 7. Limites de detecção da IMS e da PCR associada à IMS

O limite de detecção da IMS, quando usada isoladamente para recuperar salmonelas a partir de diluições de um cultivo puro de *Salmonella Typhimurium* e detectá-las através de plaqueamento em ágar seletivo, foi de aproximadamente 20 UFC por mililitro. Já o limite de detecção da PCR, quando realizada imediatamente após a IMS, foi de  $10^4$  UFC/mL. Por fim, quando a PCR foi realizada depois do

período de pós-enriquecimento em BHI que seguiu a IMS, o limite de detecção foi de 1 a 10 UFC/mL (fig.6).

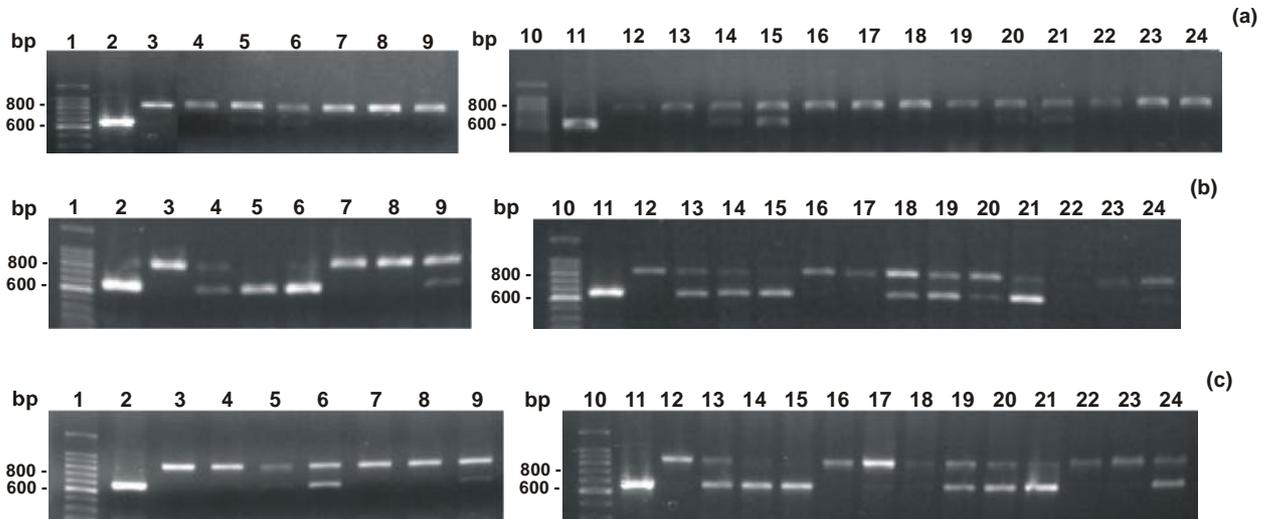


**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com os *primers* *FimA* e DNAs das salmonelas capturadas pelas microesferas a partir de cultivos puros. (a) PCR com DNAs extraídos imediatamente após a IMS; (b) PCR com DNAs extraídos após um pós-enriquecimento em BHI por 6 h a 37° C. Linhas: 1 e 12, Ladder 100 pb; 2 e 13, Controle positivo; 3 e 14, IAC; 4 e 15, Controle negativo; 5, 10<sup>7</sup> UFC/mL; 6 e 16, 10<sup>6</sup> UFC/mL; 7 e 17, 10<sup>5</sup> UFC/mL; 8 e 18, 10<sup>4</sup> UFC/mL; 9 e 19, 10<sup>3</sup> UFC/mL; 10 e 20, 10<sup>2</sup> UFC/mL; 11 e 21, 10<sup>1</sup> UFC/mL; 22, 10<sup>0</sup> UFC/mL.

## 8. Desempenho da PCR associada à IMS com amostras de carne experimentalmente contaminadas

A influência da microbiota natural dos alimentos no desempenho da metodologia desenvolvida foi investigada utilizando amostras de carne bovina, de frango e suína experimentalmente contaminadas com três quantidades de *Salmonella Typhimurium* (1-10, 10-10<sup>2</sup> e 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> UFC/25 g). Todos os resultados da avaliação do método PCR associado ou não a IMS, utilizando diferentes protocolos de enriquecimento, em amostras de carnes experimentalmente contaminadas com *Salmonella Typhimurium* estão na Tabela 4. A PCR associada à IMS foi avaliada, utilizando três protocolos de enriquecimento. Um fragmento de aproximadamente 566 pb foi amplificado a partir dos DNAs extraídos após os três protocolos de enriquecimento da carne bovina, nos dois níveis mais altos de contaminação (fig.7a) e da carne de frango nos três níveis (fig.7b). Com relação a carne suína, o fragmento correspondente ao gene *fimA* foi amplificado a partir dos DNAs extraídos após os protocolos 2 e 3 nos três níveis de contaminação e após o protocolo 1 nos dois níveis mais altos (fig.7c). Já utilizando os mesmos protocolos sem IMS antes da PCR, ocorreu amplificação do gene *fimA* somente a partir dos DNAs extraídos após os três protocolos de enriquecimento da carne de frango, e protocolos 4 e 6 da carne suína, no nível mais alto de contaminação, e após o protocolo 5 da carne suína nos dois níveis mais altos. Com isso, as sensibilidades dos protocolos com IMS 1, 2 e 3

foram, respectivamente, de 78, 89 e 89% e dos protocolos sem IMS 4, 5 e 6 foram, respectivamente, 22, 33 e 22%. O tempo total dos protocolos 2 e 3, que utilizam a IMS, foi de aproximadamente 26 e 28 h, respectivamente.



**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR amplificados com os *primers* FimA e DNAs das salmonelas capturadas ou não pelas microesferas a partir de diferentes protocolos de enriquecimentos de amostras de carnes experimentalmente contaminadas. (a) carne bovina; (b) carne de frango; (c) carne suína. Linhas: 1 e 10, Ladder 100 pb; 2 e 11, Controle positivo; 3 e 12, IAC; 4, amostra contaminada com 1 a 10 UFC/mL, protocolo 1; 5, 10 a 10<sup>2</sup> UFC/mL, protocolo 1; 6, 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL, protocolo 1; 7, 1 a 10 UFC/mL, protocolo 4; 8, 10 a 10<sup>2</sup> UFC/mL, protocolo 4; 9, 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL, protocolo 4; 13, 1 a 10 UFC/mL, protocolo 2; 14, 10 a 10<sup>2</sup> UFC/mL, protocolo 2; 15, 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL, protocolo 2; 16, 1 a 10 UFC/mL, protocolo 5; 17, 10 a 10<sup>2</sup> UFC/mL, protocolo 5; 18, 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL, protocolo 5; 19, 1 a 10 UFC/mL, protocolo 3; 20, 10 a 10<sup>2</sup> UFC/mL, protocolo 3; 21, 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL, protocolo 3; 22, 1 a 10 UFC/mL, protocolo 6; 23, 10 a 10<sup>2</sup> UFC/mL, protocolo 6; 24, 10<sup>2</sup> a 10<sup>3</sup> UFC/mL, protocolo 6. O protocolo de enriquecimento 1 consistiu de um pré-enriquecimento de 16-18 h em BPW a 37° C, seguindo-se a IMS e PCR; no 2 foi feito o mesmo pré-enriquecimento do 1, mas com um pós-enriquecimento de 6 h em caldo BHI entre a IMS e a PCR; e o 3 consistiu de um pré-enriquecimento de 8 h em BPW, seguindo-se a IMS e um pós-enriquecimento de 16-18 h em caldo BHI a 37° C antes de aplicar a PCR. Os protocolos de enriquecimento 4, 5 e 6 consistiram, respectivamente, dos protocolos 1, 2 e 3 sem a utilização da técnica de IMS.

**Tabela 4.** Desempenho da PCR, associada ou não a IMS, após diferentes protocolos de enriquecimento de amostras de carnes experimentalmente contaminadas com *Salmonella* Typhimurium.

Amostra	Nível de contaminação (UFC/mL)	Protocolos de enriquecimento						MC <sup>g</sup>
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>	4 <sup>d</sup>	5 <sup>e</sup>	6 <sup>f</sup>	
Carne bovina	1 a 10	- <sup>h</sup>	-	-	-	-	-	+
	10 a 10 <sup>2</sup>	+ <sup>i</sup>	+	+	-	-	-	+
	10 <sup>2</sup> a 10 <sup>3</sup>	+	+	+	-	-	-	+
Carne de frango	1 a 10	+	+	+	-	-	P <sup>j</sup>	+
	10 a 10 <sup>2</sup>	+	+	+	-	-	-	+
	10 <sup>2</sup> a 10 <sup>3</sup>	+	+	+	+	+	+	+
Carne suína	1 a 10	-	+	+	-	-	-	+
	10 a 10 <sup>2</sup>	+	+	+	-	+	-	+
	10 <sup>2</sup> a 10 <sup>3</sup>	+	+	+	+	+	+	+
Sensibilidade <sup>k</sup> (%)		7/9 (78)	8/9 (89)	8/9 (89)	2/9 (22)	3/9 (33)	2/9 (22)	9/9 (100)

<sup>a</sup> 16-18 h BPW, IMS, PCR

<sup>b</sup> 16-18 h BPW, IMS, 6-8 h BHI, PCR

<sup>c</sup> 8 h BPW, IMS, 16-18 h BHI, PCR

<sup>d</sup> 16-18 h BPW, PCR

<sup>e</sup> 16-18 h BPW, 6-8 h BHI, PCR

<sup>f</sup> 8 h BPW, 16-18 h BHI, PCR

<sup>g</sup> Metodologia convencional: 24 ± 2 h BPW, 24 ± 2 h RV e TT, 24-48 h XLD e BPLS, testes bioquímicos e sorológicos

<sup>h</sup> Resultado negativo

<sup>i</sup> Resultado positivo

<sup>j</sup> PCR inibida

<sup>k</sup> N<sup>o</sup> de resultados positivos de um teste/ n<sup>o</sup> de resultados positivos verdadeiros

As amostras experimentalmente contaminadas foram analisadas também através da metodologia convencional de detecção. Todas as amostras foram positivas por essa metodologia, mas foram necessárias 48 h de incubação a 37° C para a observação de colônias características nas placas de XLD e BPLS e o número de colônias obtido foi extremamente baixo. Com isso, o tempo total da análise foi de 6 dias (144 h).

## DISCUSSÃO

Um método rápido baseado em IMS e PCR para a detecção de *Salmonella* Typhimurium foi desenvolvido. Para isso, microesferas magnéticas foram sensibilizadas com um MAb específico para *Salmonella* Typhimurium e outras salmonelas do sorogrupo B e *primers* específicos para o gênero *Salmonella* foram selecionados.

Genes específicos do gênero *Salmonella*, que codificam antígenos de superfície foram escolhidos visando, inicialmente, a sua clonagem em plasmídeos de expressão em células eucarióticas para a produção de MAbs através de

imunização genética. Para isso, foram realizadas uma extensa revisão bibliográfica e pesquisas em bancos de dados de DNA, que incluíram alinhamentos das seqüências de diversos genes com as seqüências de outros sorovares e de outras bactérias ali depositadas. O gene *fimA* de *Salmonella* Enteritidis (número de acesso no GenBank S76043) foi o selecionado, pois apresentou, no alinhamento de DNA, alta similaridade com regiões alvo de várias salmonelas, tais como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Paratyphi, *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Diarizone e *Salmonella* Typhi, e baixa similaridade com outras bactérias. O par de *primers* foi selecionado visando à amplificação do gene inteiro, para aumentar a chance da expressão da proteína em sua conformação tridimensional nativa e, assim, produzir MAbs que reconheçam a bactéria íntegra. Além disso, os *primers* foram desenhados visando a clonagem direcional do gene no plasmídeo e a geração, internamente aos sítios de restrição, de um códon de iniciação ATG e um de terminação TAA nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Como o par de *primers* FimA apresentou alta especificidade e sensibilidade em testes preliminares, passou a ser avaliado para utilização no desenvolvimento de uma PCR para detecção de salmonelas em alimentos. Para a seleção de *primers* para detecção de microrganismos específicos, usualmente, somente as seqüências às quais os *primers* se anelam necessitam ser específicas para o microrganismo alvo. No presente trabalho, não só as seqüências às quais os *primers* se anelam, mas toda a seqüência do gene a ser amplificada, são específicas de salmonelas.

O gene *fimA*, constituinte de um cluster de genes, codifica a subunidade principal da fímbria tipo 1 das salmonelas (DORAN et al., 1994). Um estudo prévio (DORAN et al., 1994), que utilizou antisoro policlonal preparado contra fímbria tipo 1 purificada de *Salmonella* Enteritidis, indicou que esses antígenos fimbriais são compartilhados pela maioria dos sorovares de salmonelas, e uma análise comparativa das seqüências dos genes *fimA* de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium com genes correspondentes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens* demonstrou que somente pequenas regiões são conservadas entre os 4 gêneros avaliados. Após o seqüenciamento do gene *fimA* de *Salmonella* Enteritidis e após a análise comparativa, sondas de oligonucleotídeos foram desenhadas para detecção de salmonelas. Uma sonda hibridizou e, conseqüentemente, detectou todos os 612 isolados de salmonela de 89 sorovares

testados, enquanto outras duas sondas detectaram 97,5% e 99,7% dos isolados. Nenhuma hibridização dessas sondas foi detectada com os 250 isolados de outras enterobactérias ou com as 14 espécies de eubactérias testadas.

Os determinantes antigênicos de fímbrias tipo 1 são conservados na maioria das salmonelas, o que sugere uma conservação do gene *fimA* (COHEN; MECHANDA; LIN, 1996). O alto grau de conservação deste gene entre os sorovares de salmonela também é demonstrado pelas propriedades de sensibilidade e especificidade demonstradas em outros trabalhos. Entretanto, esses trabalhos, que usaram *primers* desenhados para amplificar pequenos fragmentos internos do gene *fimA*, apresentam limitações. Doran et al. (1994), que seqüenciaram o gene *fimA* de *Salmonella* Enteritidis utilizado no presente trabalho, desenharam três pares de *primers*, baseados somente nos alinhamentos das seqüências do gene *fimA* de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia marcescens*. Um desses *primers* gerou uma resposta falso-positiva com *Citrobacter freundii* e outro gerou bandas inespecíficas com outras bactérias. Além disso, esses *primers* foram utilizados em conjunto com outro par de *primers* (para o gene *tctC*) e não foram avaliados com amostras de alimentos experimentalmente e naturalmente contaminadas. Cohen, Mechanda e Lin (1996) desenharam *primers*, baseados em regiões do gene *fimA* de *Salmonella* Typhimurium (número de acesso no GenBank M18283), a partir do alinhamento com *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Este par de *primers* também não foi avaliado em amostras de alimentos naturalmente contaminadas com salmonelas. Já o par de *primers* desenhado por Naravaneni e Jamil (2005), foi utilizado para detectar salmonelas em amostras ambientais.

Embora a maioria dos sorovares de salmonela produzam fímbria tipo 1, alguns, como *Salmonella* Gallinarum, produzem somente fímbria tipo 2 que é estruturalmente e antígenicamente relacionada à fímbria tipo 1, mas não funcionalmente. Apesar de não produzirem fímbria tipo 1, estas bactérias foram detectadas por Western blotting utilizando antisoro policlonal anti-fímbria tipo 1 (DORAN et al., 1994). No presente trabalho, a seqüência do gene *fimA* de *Salmonella* Gallinarum foi amplificada. Isso sugere que o gene está presente, mas em forma inativa (COHEN; MECHANDA; LIN, 1996). Resultado idêntico foi encontrado por Swenson, Clegg e Old (1994), que demonstraram que *Salmonella* Typhimurium não fimbriadas também possuíam a seqüência *fimA*. Além disso,

isolados fimbriados de *Salmonella* Senftenberg, que não reagiram com soro anti-fímbria, produziram um amplicon com os *primers* FimA de *Salmonella* Typhimurium (COHEN; MECHANDA; LIN, 1996) e com os *primers* desenhados no presente trabalho. Estes resultados sugerem que todos os sorovares de salmonela, provavelmente, possuem o gene *fimA*, apesar de algumas cepas produzirem fímbrias não relacionadas antígenicamente e outras mesmo não produzirem fímbrias.

Gooding e Choudary (1999), Malorny et al. (2003) e Ziemer e Steadham (2003) avaliaram várias PCRs para salmonelas e demonstraram que algumas falharam em identificar todos os sorovares de salmonelas testados ou produziram bandas múltiplas inespecíficas. Além disso, algumas produziram bandas de tamanho esperado com o DNA de outras bactérias. A PCR desenvolvida no presente trabalho não apresentou bandas inespecíficas na amplificação de salmonelas, nenhuma banda de tamanho esperado com o DNA de outras bactérias e apresentou 100% de sensibilidade e especificidade. Com isso, concluiu-se que os *primers* avaliados nesse trabalho foram específicos para as cepas de salmonelas testadas e, portanto, passível de utilização na detecção destes microorganismos através de PCR.

Embora a técnica de PCR seja extremamente sensível, sua sensibilidade pode ser drasticamente reduzida quando aplicada a amostras biológicas complexas, como alimentos, que possuem diversos componentes inibidores para a reação, tais como lipídeos, sais e proteínas. Além disso, DNA e células de outros organismos (microbiota competitiva) também afetam a sensibilidade e especificidade da PCR. Com isso, para indicar resultados falso-negativos causados por inibidores da reação, é necessário utilizar controles internos de amplificação (IAC) na detecção de bactérias em alimentos através de PCR. A presença de um produto IAC na ausência do produto alvo da PCR permite a diferenciação entre resultados verdadeiro e falso negativos. Neste trabalho, um IAC foi construído de forma a ser amplificado pelo mesmo par de *primers* usado para amplificar o DNA alvo. Desse modo, o DNA alvo e o IAC são amplificados sob as mesmas condições. Esta estratégia, conhecida como método competitivo devido à competição existente entre o DNA alvo e o IAC pelos *primers*, é a mais recomendada, pois além de permitir a amplificação de ambos DNAs sob as mesmas condições também evita o risco de interações indesejadas entre múltiplos *primers* (HOORFAR et al., 2004).

Outra vantagem da metodologia utilizada para a construção do IAC é que, como a seqüência do IAC interna aos *primers* é completamente diferente da seqüência alvo, não ocorre formação de dímeros entre os produtos do DNA alvo e IAC (SACHADYN; KUR, 1998; JONES et al., 2000). Além disso, o produto do IAC deste trabalho foi construído para ser maior (850 pb) do que o do alvo (566 pb), pois, em teoria, a cinética da reação é dirigida para o menor produto da PCR (SACHADYN; KUR, 1998). A seqüência do IAC foi clonada em um plasmídeo e este foi armazenado em células de *Escherichia coli*. Este método, além de ser o mais seguro para estocagem de DNA, facilita o controle da estabilidade, tamanho e número de cópias, garante a qualidade e fornece quantidade ilimitada de IAC (HOORFAR et al., 2004).

A quantidade de IAC é crítica para o limite de detecção. Se utilizado em altas concentrações, competirá com o produto do DNA alvo inibindo a sua amplificação. Além disso, poderá não detectar fraca inibição quando o DNA alvo estiver presente em concentrações extremamente baixas, resultando em diminuição do limite de detecção ou em resultados falso-negativos (ROSENSTRAUS et al., 1998). A concentração ótima de IAC, determinada cuidadosamente por experimentos de titulação, foi de 0,5 µg/25 µL de reação e foi semelhante a de outros IACs utilizados em PCRs para detecção de salmonelas (AMAVISIT et al., 2001; CUBERO et al., 2002). O limite de detecção da PCR com DNA puro de 1,5 µg/25 µL de reação não foi influenciado pela presença do IAC e foi melhor do que o encontrado por Cohen, Mechanda e Lin (1996) utilizando outro par de *primers* para *fimA* (5 µg). Já o limite de detecção de salmonelas em cultivo foi de 10<sup>4</sup> UFC/mL ou 500 UFC por reação.

Para o desenvolvimento do protocolo de IMS, inicialmente, foi preparado um reagente composto de microesferas magnéticas cobertas com proteína A sensibilizadas com um MAb específico para *Salmonella* Typhimurium. A quantidade de MAb adsorvido em cada miligrama de microesferas foi de aproximadamente 0,7 mg, o que correspondeu a 58% do MAb utilizado na sensibilização. Essa proporção de adsorção foi similar à obtida por Conceição (2004), que utilizou o mesmo protocolo para adsorver IgG purificada de soro polivalente somático anti-salmonela às mesmas microesferas.

A qualidade do reagente foi avaliada quanto à tendência a auto-agregação e quanto à capacidade de aglutinar um cultivo puro de *Salmonella* Typhimurium e não

aglutinar *Escherichia coli*. A observação microscópica do reagente revelou uma pequena auto-agregação das microsferas e aglutinação apenas das salmonelas. Estes resultados sugerem que a utilização de MAb específicos para salmonelas pode melhorar a especificidade da IMS, já que soros policlonais, embora possam ser usados, freqüentemente, apresentam reações cruzadas com outras enterobactérias presentes em carnes.

Com base nestes resultados concluiu-se que a sensibilização das microesferas com o MAb foi satisfatória, uma vez que foi conseguida uma boa adsorção, as microesferas sensibilizadas ficaram bem dispersas, apresentando apenas uma leve auto-agregação, e aglutinaram somente na presença de cultivos puros de salmonelas.

O limite de detecção, ou seja, o número mínimo de salmonelas necessário para se obter uma reação positiva na PCR e no plaqueamento em ágar XLD, quando usados associados à IMS, foi determinado. O plaqueamento em ágar XLD demonstrou que a IMS foi capaz de capturar, aproximadamente, 20 células de salmonelas por mililitro. Resultados similares foram encontrados por outros autores. Mansfield e Forsythe (2001) e Conceição (2004) capturaram salmonelas em cultivos contendo 1 a 10 UFC/mL e 20 UFC/mL, respectivamente, após IMS e plaqueamento em ágar XLD. Angen et al. (2001) capturaram 10 células de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, agente causador da pleuropneumonia suína, a partir de 1 mL de cultivos mistos. Já YU, UKNALIS e TU (2001) conseguiram capturar *Campylobacter jejuni* através da IMS em cultivos contendo  $10^3$  UFC/mL.

O limite de detecção da PCR, quando realizada imediatamente após a IMS, foi de  $10^4$  UFC/mL, e quando foi feito um pós-enriquecimento entre a IMS e a PCR baixou para 1 a 10 UFC/mL. Além disso, a IMS foi capaz de recuperar, aproximadamente, 20 células de *Salmonella* Typhimurium quando associada a plaqueamento em ágar seletivo. Estes resultados sugerem que a IMS com microesferas magnéticas cobertas com MAb anti-*Salmonella* Typhimurium é uma técnica eficiente para a concentração e separação de salmonelas de culturas líquidas. Apesar do limite de detecção da PCR associada à IMS ter sido o mesmo obtido quando foi usada somente PCR ( $10^4$  UFC/mL), a intensidade da banda obtida com IMS foi mais intensa, o que demonstra a importância da IMS para aumentar a sensibilidade da PCR. Entretanto, devido ao pequeno volume de DNA utilizado na PCR (1  $\mu$ L) este limite de detecção ainda pode ser considerado muito alto. Assim,

para baixar o limite de detecção do método para um nível de 1 a 10 UFC/mL, uma etapa adicional de 6 h de enriquecimento em BHI entre a IMS e a PCR torna-se necessária. Outros estudos compararam a sensibilidade da PCR para detecção de salmonelas após IMS, centrifugação e filtração do meio de enriquecimento, e de todos, o melhor resultado foi obtido com IMS (KONGMUANG; LUK; LINDBERG, 1994, RIJPENS et al., 1999).

A IMS foi também utilizada para concentrar salmonelas a partir do caldo de pré-enriquecimento de amostras de carne com o objetivo de separá-las de substâncias inibidoras e de outras bactérias, as quais podem inibir a reação de PCR e, conseqüentemente, reduzir sua sensibilidade. Neste caso, a PCR associada à IMS foi aproximadamente 100 vezes mais sensível do que a PCR sem IMS. Entre os protocolos de enriquecimento testados, que incluem IMS e PCR, os que apresentaram bandas mais nítidas e as maiores sensibilidades foram o 2 e 3. Entretanto, Rijpens et al. (1999) avaliaram o crescimento de células estressadas de *Salmonella* Panama utilizando períodos de incubação variando de 4 a 25 h e concluíram que um pré-enriquecimento de, no mínimo, 16 h é necessário para obter uma quantidade de salmonela detectável por PCR. Além disso, os kits de detecção de salmonelas baseados em PCR disponíveis comercialmente, como o Probelia<sup>®</sup>, TaqMan<sup>®</sup> e Bax<sup>®</sup>, utilizam um pré-enriquecimento de 16 a 20 h antes da PCR. Por isso, o protocolo 2, que incluiu um pré-enriquecimento de 16-18 h em BPW, seguido de IMS, pós-enriquecimento de 6 h em caldo BHI e, finalmente, PCR, deve ser o escolhido para avaliar esta metodologia de detecção com amostras de carne naturalmente contaminadas com salmonelas. Além disso, esse protocolo é o mais prático e coerente, pois utiliza um pré-enriquecimento longo que possibilita uma melhor recuperação de células lesadas e aumento do número de salmonelas para captura pela IMS, e um pós-enriquecimento breve, com tempo suficiente para o crescimento das salmonelas a um nível detectável pela PCR. O protocolo 2 foi capaz de detectar 1 a 10 UFC de salmonelas por 25 g de carne. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Trkov et al. (1999), Jeníková, Pazlarová e Demnerová (2000) e Rijpens et al. (1999), e melhor do que o encontrado por Civilini et al. (2000). O protocolo de enriquecimento utilizado por Trkov et al. (1999) foi semelhante ao 3 do presente trabalho, com exceção do enriquecimento seletivo em RV, feito após a IMS naquele trabalho, que foi substituído por um pós-enriquecimento não-seletivo em BHI. Esse protocolo apresentou resultados falso-

negativos devido, provavelmente, ao fato do período de pré-enriquecimento ser muito curto e não fornecer quantidade suficiente de salmonelas para a IMS. Os protocolos de enriquecimento com IMS testados no presente trabalho não necessitam de um enriquecimento seletivo, pois a seletividade é dada pela utilização do MAb anti-*Salmonella* Typhimurium adsorvido às microesferas.

A eficiência da PCR, tanto utilizada sozinha como associada à IMS, foi influenciada de forma diferente quando aplicada aos protocolos de enriquecimento dos três tipos de carnes. Quando aplicada aos protocolos de enriquecimento da carne bovina, sua eficiência foi menor do que quando aplicada aos das outras duas carnes. Isso indica que, provavelmente, a carne bovina continha microrganismos competidores que cresceram melhor do que a salmonela ou que continha mais substâncias inibidoras ou inibidores mais potentes da PCR.

Muitas vezes, a utilização da IMS associada à metodologia convencional também obtém bons resultados, como recuperação de menos de 10 células de salmonela em 25 g de alimento experimentalmente contaminado (CUDJOE; KRONA, 1997; CONCEIÇÃO, 2004). Entretanto, as etapas de plaqueamento em ágar seletivo e de confirmação bioquímica e sorológica levam a um aumento de 2 a 3 dias no tempo total do teste em relação à IMS-PCR. Conceição (2004) e Mansfield e Forsythe (1996) conseguiram diminuir o tempo de detecção de salmonelas em cerca de 24 h em relação a metodologia convencional e Cudjoe e Krona (1997), em torno de 2 dias. O tempo total do método desenvolvido no presente trabalho foi de aproximadamente 26 h. Com isso, esse método foi capaz de diminuir o tempo de detecção de salmonelas em cerca de 5 dias em relação a metodologia convencional.

Os resultados da avaliação da PCR associada à IMS demonstraram que a utilização das microesferas magnéticas cobertas com MAb anti-*Salmonella* Typhimurium, é uma técnica eficiente para separação e concentração de salmonelas de culturas líquidas. A IMS desenvolvida foi usada com sucesso associada à PCR para detecção de salmonelas, aumentando a sua sensibilidade, especificidade e velocidade de obtenção de resultados na detecção específica de *Salmonella* Typhimurium em carne.

## REFERÊNCIAS

- AMAVISIT, P., BROWNING, G.F., LIGHTFOOT, D., CHURCH, S., ANDERSON, G.A., WHITHEAR, K.G., MARKHAM, P.F. Rapid PCR detection of *Salmonella* in horse faecal samples. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.63-74. 2001.
- ANGEN, O., HEEGAARD, P.M.H., LAVRITSEN, D.T., SORENSEN, V. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 by immunomagnetic separation. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.19-29. 2001.
- BAM/FDA. **Bacteriological Analytical Manual/ Food and Drug Administration**, 8th, Arlington: Association of Official Analytical Chemists. 1998.
- BLACKBURN, C.W. A review: Rapid and alternative methods for the detection of salmonellae in foods. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.199-214. 1993.
- CHEN, S.; YEE, A.; GRIFFITHS, M.; LARKIN, C.; TAMASHIRO, C.T.; BEHARI, R.; PASZKOKOLVA, C.; RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.239-250. 1997.
- CHIU, T.-H.; CHEN, T.-R.; HWANG, W.-Z.; TSEN, H.-Y. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.259-265. 2005.
- CIVILINI, M.; VENUTI, F.; de BERTOLDI, M. Recovery of *Salmonella typhimurium* from compost with the IMS-PCR method. **Waste Manage Research**, v.18, p.572-576. 2000.
- COHEN, H.J.; MECHANDA, S.M.; LIN, W. PCR Amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4303-4308. 1996.
- CONCEIÇÃO, R.C.S. **Detecção de *Salmonella* em produtos de frango usando a separação imunomagnética**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) DCTA, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas.
- CUBERO, J.; van der WOLF, J.; van BECKHOVEN, J.; LÓPEZ, M.M. An internal control for the diagnosis of crown gall by PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v.51, p.387-392. 2002.
- CUDJOE, K.S.; KRONA, R.; OLSEN, E. IMS: a new enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.159-165. 1994.
- CUDJOE, K.S.; HAGTVEDT, T.; DAINY, R. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, p.11-25. 1995.
- CUDJOE, K.S.; KRONA, R. Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads anti-*Salmonella* and a conventional reference method. **International Journal of Food Microbiology**, v.37, p.55-62. 1997.
- DORAN, J.L.; COLLINSON, S.K.; KAY, C.M.; BANSER, P.A.; BURIAN, J.; MUNRO, C.K.; LEE, S.H.; SOMERS, J.M.; TODD, E.C.D.; KAY, W.W. *fimA* and *tctC* based DNA diagnostics for *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.8, p.291-310. 1994.
- FACH, P., DILASSER, F., GROUT, J., TACHE, J. Evaluation of a polymerase chain reaction base test for detecting *Salmonella* spp. in foods samples: Probabilia *Salmonella* spp. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1387-1393. 1999.

FERRETTI, R.; MANNAZZU, L.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based Method for Detection of *Salmonella* spp. in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.977-978. 2001.

GOODING, C.M.; CHOUDARY, P.V. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v.13, p.341-347. 1999.

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

HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Minireview: Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.5, p.1863-1868. 2004.

HSIH, H.Y.; TSEN, H.Y. Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. **Journal of Food Protection**, v.64, n.11, p.1744-1750. 2001.

JENÍKOVÁ, G.; PAZLAROVÁ, J.; DEMNEROVÁ, K. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. **International Microbiology**, v.3, p.225-229. 2000.

JONES, R. N.; NEALE, M. L.; BEATTIE, B.; WESTMORELAND, D.; FOX, J. D. Development and application of a PCR-based method including an internal control for diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1-6. 2000.

KONGMUANG, U.; LUK, J.M.C.; LINDBERG, A.A. Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and D by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.12, p.3072-3074.

LEWIS, M.J. *Salmonella*. In: GREENWOOD, D.; SLACK, R.C.B.; PEUTHERER, J.F. **Medical Microbiology**, 15th ed. Churchill Livingstone, London, 1997. p.252- 261.

LI, X.M.; BOUDJELLAB, N.; ZHAO, X. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, n.2-3, p.167-177. 2000.

LIN, C.K.; TSEN, H.Y. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotide as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.80, p.659-666. 1996.

LIN, J.S.; TSEN, H.Y. Development and use of polymerase chain reaction for the specific detection of *Salmonella typhimurium* in stool and food samples. **Journal of Food Protection**, v.63, n.10, p.1103-1110. 1999.

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

MANDRELL, R.E.; WACHTEL, M.R. Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry-Review. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n.3, p.273-278. 1999.

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

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

NARAVANENI, R.; JAMIL, K. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, n.1, p.51-54. 2005.

OLSEN, S.J., MACKINNON, L.C., GOULDING, J.S., BEAN, N.H., SLUTSKER, L. Surveillance for Foodborne-disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p.1-62. 2000.

RIJPENS, N.; HERMAN, L.; VERECCKEN, F.; JANNES, G.; DE SMEDT, J.; DE ZUTTER, L. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, n.1, p. 37-44. 1999.

ROSENSTRAUS, M.; WANG, Z.; CHANG, S.-Y.; DEBONVILLE, D.; SPADORO, J. P. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.191-197. 1998.

SACHADYN, P.; KUR, J. The construction and use of a PCR internal control. **Molecular Cellular Probes**, v.12, p.259-262. 1998.

ŠPANOVÁ, A; RITTICH, B.; KAPÍSKOVÁ, R.; CECHOVÁ, L.; SKAPOVÁ, D. PCR identification of *Salmonella* cells in food and stool samples after immunomagnetic separation. **Bioseparation**, v.9, p.379-384. 2001.

ŠPANOVÁ, A; RITTICH, B.; HORÁK, D.; LENFELD, J., PRODELALOVÁ, J.; SUCIKOVÁ, J.; STRUMCOVÁ, S. Immunomagnetic separation and detection of *Salmonella* cells using newly designed carriers. **Journal of Chromatography A**, v.1009, p. 215-221. 2003.

SWAMINATHAN, B.; FENG, P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.48, p.401-426. 1994.

SWENSON, D.L.; CLEGG, S.; OLD, D.C. Frequency of the *fim* genes among *Salmonella* serovars. **Microbial Pathogens**, v.10, p.497-498. 1994.

TRKOV, M.; MAJERIKOVA, I.; JERASEK, B.; STEFANOVICOVA, A.; RIJPENS, N.; KUČHTA, T. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v.16, n.4, p.393-399. 1999.

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

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

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

#### 4. CONCLUSÕES

- O painel de 10 MAbs produzidos e caracterizados reagem especificamente com salmonelas do sorogrupo B.
- Todos os MAbs reagem com determinantes antigênicos de uma proteína de membrana externa de *Salmonella* Typhimurium e apresentam afinidade adequada para uso em ensaios imunológicos para detecção desta bactéria em alimentos.
- O ELISA sanduíche para detecção de *Salmonella* Typhimurium em carnes, desenvolvido com os MAbs, apresenta boa sensibilidade e especificidade em experimentos com cultivo puro e com carne experimentalmente contaminadas.
- O reagente desenvolvido para uso em IMS, composto de microesferas magnéticas e MAb, separa e concentra eficientemente *Salmonella* Typhimurium a partir de culturas puras e de carne experimentalmente contaminada.
- A PCR desenvolvida, tendo como alvo o gene *fimA* de salmonelas, apresenta 100% de sensibilidade e especificidade em experimentos de amplificação do DNA de salmonelas de diversos sorogrupos e de outras bactérias.
- A associação entre a IMS e a PCR para amplificação do gene *fimA* consiste em uma nova metodologia para detecção de *Salmonella* Typhimurium em carne que é completada em cerca de 27 horas.

## 5. REFERÊNCIAS

- AHMED, R., SOULE, G., DEMCZUK, W.H., CLARK, C., KHAKRIA, R., RATNAM, S., MARSHALL, S., NG, L.K., WOODWARD, D.L., JOHNSON, W.M., RODGERS, F.G. Epidemiologic typing of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.6, p.2403-2406. 2000.
- ANDREWS, W.R. A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of *Salmonella* in foods. **Food Technology**, v.39, p.77-82. 1985.
- ANONYMOUS. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens. General method specific requirements (EN ISO 22174). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2002.
- ARNOLD, T.; SCHOLZ, H.C.; MARG, H.; RÖSLER, U.; HENSEL, A. Impact of *invA*-PCR and Culture Detection Methods on Occurrence and Survival of *Salmonella* in the Flesh, Internal Organs and Lymphoid Tissues of Experimentally Infected Pigs. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.51, p.459-463, 2004.
- BLACKBURN, C.W. A review: Rapid and alternative methods for the detection of salmonellae in foods. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.199-214. 1993.
- BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.7, p.2465-2467. 2000.
- BROWN, J.G.; BROOKS, B.W.; BLAIS, B.W.; YAMAZAKI, H. Application of Cloth-based enzyme immunoassay for the characterization of monoclonal antibodies to *Salmonella* lipopolysaccharide antigens. **Immunological investigations**, v.25, n.4, p.369-381. 1996.
- BURTSCHER, C.; FALL, P.A.; WILDERER, P.A.; WUERTZ, S. Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in suspended organic waste by nucleic acid extraction and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.5, p.2235-2237. 1999.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDCa). *Salmonella* surveillance annual tabulation summary - 1996. US Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1996.
- CDCb. Surveillance for foodborne-disease outbreaks-United States, 1988-1992. **Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC Surveillance Summaries**, v. 45, p.1-66. 1996.
- CDC. Salmonellosis – United States, December, 2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p.48. 2000.
- CDC. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses – selected sites, United States, 2000. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.50, p.241-246. 2001.
- CDC. *Salmonella* surveillance summary, 2002. Atlanta, GA, USA: US Department of Health and Human Services. 2003.
- CDC. PHILIS surveillance data: *Salmonella* Annual Summaries. CDC. Atlanta, GA. Disponível em: [www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm). Acesso em: 4 fev. 2004.
- CHAICUMPA, W.; NGREN-NGARMLERT, W.; KALAMBAHETI, T.; CHONGSANGUAN, Y.R.M.; TAPCHAI SRI, P.; DESAKORN, V.; SUTHIENKUL, O. Monoclonal antibody-based Dot Blot ELISA for the detection of *Salmonella* in foods. **Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology**, v.13, p.159-166. 1995.
- CHE, Y.H.; LI, Y.; SLAVIK, M.; PAUL, D. Rapid detection of *Salmonella* Typhimurium in chicken carcass wash water using an immunoelectrochemical method. **Journal of Food Protection**, v.63, n.8, p.1043-1048. 2000.

- CHEN, S.; YEE, A.; GRIFFITHS, M.; LARKIN, C.; TAMASHIRO, C.T.; BEHARI, R.; PASZKOKOLVA, C.; RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A. The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v.35, p.239-250. 1997.
- CHIU, T.-H.; CHEN, T.-R.; HWANG, W.-Z.; TSEN, H.-Y. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.259-265. 2005.
- COHEN, H.J.; MECHANDA, S.M.; LIN, W. PCR Amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4303-4308. 1996.
- COLEMAN, D.J.; CHICK, K.E.; NYE, K.L. An evaluation of immunomagnetic separation for the detection of Salmonellae in raw chicken carcasses. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, n.3, p.152-154. 1995.
- COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.342-346. 2002.
- CROCI, L.; DELIBATO, E.; VOLPE, G.; DE MEDICI, D.; PALLESCI, G. Comparison of PCR, electrochemical enzyme-linked immunosorbent assays, and the standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n. 3, p.1393-1396. 2004.
- CUDJOE, K.S., KRONA, R., OLSEN, E. IMS: a new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, p.159-165. 1994.
- CUDJOE, K.S.; HAGTVEDT, T.; DAINTY, R. Immunomagnetic separation of *Salmonella* from foods and their detection using immunomagnetic particle (IMP)-ELISA. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, p.11-25. 1995.
- D'AOUST, J.Y. *Salmonella* Species. In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. New Jersey: Hardcover, 2001. p.129-157.
- DALY, M.; FANNING, S. Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.11, p.4842-4848. 2000.
- DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, p.405-428.1999.
- de BOER, E.; BEUMER, R.R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, p.119-130. 1999.
- DIVISÃO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DA SECRETARIA DE SAÚDE E MEIO AMBIENTE-DVSSSMA. **Programa de controle e enfermidades transmitidas por alimentos, relatório anual**. Porto Alegre, RS: Secretaria de Saúde e Meio Ambiente, 1997. 24p.
- DORAN, J.L.; COLLINSON, S.K.; KAY, C.M.; BANSER, P.A.; BURIAN, J; MUNRO, C.K.; LEE, S.H.; SOMERS, J.M.; TODD, E.C.D.; KAY, W.W. *fimA* and *tctC* based DNA disgnostics for *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.8, p.291-310. 1994.
- DREESEN, D.W. Hazard Analysis and Critical Control Point systems as a preventive tool - Review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n.12, p.1741-1744. 1998.
- FACH, P., DILASSER, F., GROUT, J., TACHE, J. Evaluation of a polimerase chain reaction base test for detecting *Salmonella* spp, in foods samples: Probelia *Salmonella* spp. **Journal of Food Protection**, v.62, p.1387-1393. 1999.

FARMER, J.J.; MCWHORTER, A.C.; BRENNER, D.J.; MORRIS, G.K. The *Salmonella*-Arizona group of *Enterobacteriaceae*: nomenclature, classification and reporting. **Clinical Microbiology**, v.6, p.63-66. 1984.

FAVRIN, S.J., JASSIM, S.A., GRIFFITHS, M.W. Development and Optimization of a novel immunomagnetic separation – bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.7, p.217-224. 2001.

FDA/CFSAN. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook: The “Bad Bug Book”. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration. Disponível em: [www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html](http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html). Acesso em: 24 nov. 2003.

FELDSINE, P.T.; NELSON, M.T.F.; HUSTEAD, D.L. Policlonal enzyme immunoassay method for detection of motile and non-motile *Salmonella* in foods: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists International**, v.76, n.4, p.694-697. 1993.

FERRETTI, R.; MANNAZZU, L.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based Method for Detection of *Salmonella* spp. in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.977-978. 2001.

FITTS, R.; DIAMONDS, M.; HAMILTON, C.; NERI, M. DNA-DNA hibridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, p.1146-1149. 1983.

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

GOODING, C.M.; CHOUDARY, P.V. Comparison of different primers for rapid detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v.13, p.341-347. 1999.

HAGE, D.S. Clinical Chemistry, Immunoassays. **Analytical Chemistry**, v.63, p.12, 1991.

HEINITZ, M.L.; RUBLE, R.D.; WAGNER, D.E.; TATINI, S.R. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. **Journal of Food Protection**, v.63, n.5, p.579-592. 2000.

HIRSH, D.C.; MARTIN, L.D. Rapid detection of *Salmonella* in certified raw milk by using charge-modified filters and Felix-01 bacteriophage. **Journal of Food Protection**, v.47, p.388-390. 1984.

HSIH, H.Y.; TSEN, H.Y. Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. **Journal of Food Protection**, v.64, n.11, p.1744-1750. 2001.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 32d, Zaragoza: Editorial Acribia, 1992. 804p.

KEITH, M. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of salmonellae in foods. **Journal of Food Protection**, v.60, n.6, p.682-685. 1997.

KERR, S.; BALL, H.J.; MACKIE, D.P.; POLLOCK, D.A.; FINLAY, D.A. Diagnostic application of monoclonal antibodies to outer membrane protein for rapid detection of *Salmonella*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.302-308. 1992.

KHAKRIA, R., WOODWARD, D., JOHNSON, W.M., POPPE, C. *Salmonella* isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983-92. National Laboratory for Enteric Pathogens, Health Canada, Ottawa, Ontario, Canada. **Epidemiology Infections**, v.119, n.1, p.15-23. 1997.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497. 1975.

KONG, H.; YEUNG, S. An overview of notifiable infectious diseases in the Hong Kong Special Administrative Region in 1998. **Public Health & Epidemiology Bulletin**, v.8, p.11-15. 1999.

- LEWIS, M.J. *Salmonella*. In: GREENWOOD, D.; SLACK, R.C.B.; PEUTHERER, J.F. **Medical Microbiology**, 15th ed. Churchill Livingstone, London, 1997. p.252- 261.
- LIN, C.K., TSEN, H.Y. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotide as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.80, p.659-666. 1996.
- MALORNY, B.; HOORFAR, J; HUGAS, M; HEUVELINK, A.; FACH, P; ELLERBROEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, p.241-249. 2003.
- MANSFIELD, L.; FORSYTHE, S.J. Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for *Salmonella* detection. **Letters in Applied Microbiology** , v.16, p.122-125. 1993.
- MANSFIELD, L.; FORSYTHE, S. Collaborative ring-trial of Dynabeads anti-*Salmonella* for immunomagnetic separation of stressed *Salmonella* cells from herbs and spices. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.41-47. 1996.
- MANSFIELD, L.P.; FORSYTHE, S.J. The detection of *Salmonella* serovars from animal feed and raw chicken using a combined immunomagnetic separation and ELISA method. **Food Microbiology**, v.18, p.361-366. 2001.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F., BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infection Disease**, v.5, p.607-625. 1999.
- MISHU, B.; KOEHLER, J.; LEE, L.A.; RODRIGUE, D.; HICKMAN-BRENNER, F.; BLAKE, P.; TAUXE, R.V. Outbreaks of *Salmonella* Enteritidis infections in the United States, 1985-1991. **Journal Infection Disease**, v.169, p.547-552. 1994.
- MOK, T. Review of notifiable infectious diseases in 2000. **Public Health & Epidemiology Bulletin**, v.10, p.37-41. 2001.
- OLSEN, S.J., MACKINNON, L.C., GOULDING, J.S., BEAN, N.H., SLUTSKER, L. Surveillance for Foodborne-disease outbreaks - United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.49, p.1-62. 2000.
- OLSVIK, O.; POPOVIC, T.; SKJERVE, E.; CUDJOE, K.S.; HOMES, E.; UGELSTAD, J.; UHLEN, M. **Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology**. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, p.43-54. 1994.
- OZFOODNET WORKING GROUP. Foodborne disease investigation across Australia: annual report of the OzFoodNet network. **Communicable Diseases Intelligence**, v.28, n.3, p.359-389. 2004.
- PEPLOW, M.O.; PRISANT, M.C.; STEBBINS, M.E.; JONES, F.; DAVIES, P. Sensitive, specificity and predictive values of three *Salmonella* rapid detection kits using fresh and frozen poultry environmental samples versus those of standard plating. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.3, p.1055-1069. 1999.
- POPOFF, M.Y., LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7<sup>th</sup> revision. World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Pasteur Institute, France. 1997.
- POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W. Supplement 1998 to the Kauffmann-White scheme. **Research Microbiology**, v.151, p.63-65. 2000.
- RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A.J. Review: Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v.3, p.237-247. 2001.

RADSTRÖM, P.; LÖFSTRÖM, C.; LÖVENKLEV, M.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P. Strategies for overcoming PCR inhibition. In: DIEFENBACH, C. W.; DVEKSLER, G. S. **PCR primer: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, 2003. p.149-161.

RAMBACH, A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.301-303. 1990.

REIS, E.M.F.; COSTA, R.G.; SOLARI, C.A. Sorovares de *Salmonella* caracterizados no biênio 1992-1993 no Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). In: **Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 1993, São Paulo. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Microbiologia. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1993. p.141.

RIJPENS, N.; HERMAN, L.; VERECCKEN, F.; JANNES, G.; DE SMEDT, J.; DE ZUTTER, L. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.46, n.1, p. 37-44. 1999.

SEO, K.H.; BRACKETT, HARTMAN, N.F.; CAMPBELL, D.P. Development of a rapid response biosensor for detection of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Food Protection**, v.62, n.5, p.431-437. 1999.

SHARMA, V. K.; CARLSON, S. A. Simultaneous detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157:H7 with fluorogenic PCR and single enrichment- broth culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5472-5476. 2000.

SINELL, H.J. Control of food-borne infections and intoxications - Review. **International Journal of Food Microbiology**, v.25, n.3, p.209-217.1995.

SWAMINATHAN, B.; FENG, P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.48, p.401-426. 1994.

TAUXE, R. V. *Salmonella*: a postmodern pathogen. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 356-368. 1991.

THORNS, J.J. Bacterial food-borne zoonoses. **Revue Scientifique et Technique**, v.19, n.1, p.226-239. 2000.

TIJSSEN, P. Practice and theory of enzyme immunoassay. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. New York: Elsevier, 1985. 549 p.

TRKOV, M.; MAJERIKOVA, I.; JERASEK, B.; STEFANOVICOVA, A.; RIJPENS, N.; KUCHTA, T. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. **Food Microbiology**, v.16, n.4, p.393-399. 1999.

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

USDA/ERS, 2003. Economics of foodborne disease: Feature. U.S. Dept. of Agriculture Economic Research Service. Disponível em: [www.ers.gov/briefing/FoodborneDisease/features.htm](http://www.ers.gov/briefing/FoodborneDisease/features.htm). Acesso em 13 jan. 2005.

VUGIA, D.J., SAMUEL, M., FARLEY, M.M., MARCUS, R., SHIFERAW, B., SHALLOW, S., SMITH, K., ANGULO, F.J. The Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996–1999: incidence, serotype distribution, and outcome. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, n.3, p.149-156. 2004.

WANG, R.F.; CAO, W.W.; JOHNSON, M. G. 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2827-2831. 1992.

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

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)