

Produção e purificação de anticorpos policlonais para *Salmonella* Enteritidis (Enterobacteriaceae)

Iliana Alcocer¹, Eiko Itano², Mario Augusto Ono² e Tereza Cristina R. M. de Oliveira^{1*}

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, C.P. 6001-86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. ²Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, C.P. 6001-86051-970, Londrina, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: tereza@uel.br

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi produzir e purificar anticorpos policlonais específicos para *Salmonella* Enteritidis (Enterobacteriaceae). O anti-soro foi produzido em coelhos, empregando-se flagelina purificada. O título e a especificidade foram determinados através do ensaio imunoenzimático - ELISA e a purificação por cromatografia de afinidade com sepharose Proteína A. As suspensões bacterianas foram cultivadas em cinco diferentes meios de cultura (infusão de cérebro coração - BHI, caldo tripticase soja, caldo lactosado, caldo nutriente - CN e água peptonada). Observou-se que dependendo do meio o título do anti-soro pode variar e os melhores resultados foram obtidos com BHI e CN. O anti-soro foi específico para *Salmonella* Enteritidis, apresentando porcentagens de reações cruzadas com *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis e *Salmonella* Newport de 16,0, 11,9 e 6,4%, respectivamente. Menores porcentagens foram obtidas com outras enterobactérias testadas. Esses resultados indicam a possibilidade da utilização desses anticorpos na padronização de ensaios imunológicos para a detecção de *Salmonella* Enteritidis.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, ELISA, anticorpo policlonal, meios de cultura.

ABSTRACT. Production and purification of polyclonal antibodies for *Salmonella* Enteritidis (Enterobacteriaceae). The purpose of this study was to produce and to purify specific polyclonal antibodies for *Salmonella* Enteritidis (Enterobacteriaceae). The anti-serum was raised in rabbits using purified flagelin. Anti-serum titer and specificity were determined by an immunoassay - ELISA and its purification was performed by sepharose protein A affinity chromatography. The bacteria suspensions were cultivated in five different media (brain heart infusion - BHI, tripticase soy broth, nutrient broth - NB, peptone water). Results have showed that anti-serum titers varied depending on which media type was used and BHI and NB media yielded the most significant results. The anti-serum produced was specific for *Salmonella* Enteritidis. Its cross-reactivity with *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis and *Salmonella* Newport were 16.0, 11.9 and 6.4% respectively and lower percentages than those were observed in other Enterobacteriaceae species tested. Results indicate that these polyclonal antibodies may be used in standardization of immunological assays for *Salmonella* Enteritidis detection.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, ELISA, polyclonal antibody, culture media.

Introdução

Salmonella spp. é o principal patógeno responsável por toxinfecção alimentar em 22 dos 49 países examinados pela Organização Mundial da Saúde em 2001 (World Health Organization, 2001), e as infecções causadas por *Salmonella* e *Campylobacter* correspondem a mais de 90% de todos os casos reportados de toxinfecção alimentar em várias partes do mundo (Thorns, 2000).

Nos últimos anos tem ocorrido um aumento do número de surtos de salmonelose causados por *Salmonella* Enteritidis devido ao consumo de carne de aves, ovos e derivados contaminados (World Health

Organization, 2001). Esse sorotipo tem sido isolado com frequência no Brasil, tanto de materiais de origem humana como de alimentos, estando entre os 10 sorotipos mais comuns (Kaku *et al.*, 1995; D'Aoust, 1997; Camargo *et al.*, 1999).

No Estado do Paraná, a partir de 1995, a salmonelose tem sido a principal enfermidade notificada, sendo que, em 1998, 57,1% dos surtos confirmados laboratorialmente foram causados por *Salmonella* (Camargo *et al.*, 1999).

O método convencional de detecção de *Salmonella* em alimentos, além de dispendioso e trabalhoso, consome longo tempo, necessitando-se normalmente de 4 a 5 dias para a confirmação da

presença dessa bactéria em alimentos. O emprego de métodos rápidos e simples, porém confiáveis, é, portanto, premente tanto no diagnóstico de toxinfecção, como também, e principalmente, no controle de qualidade de alimentos.

Diversos métodos para detecção de *Salmonella* têm sido desenvolvidos (Gazzaz et al., 1992; Keith, 1997; Blais et al., 1998; Miyamoto, 1998; Michalski et al., 1999; AOAC, 2001; Ferreti et al., 2001). Mas os imunoenaios são os mais utilizados por serem rápidos, altamente sensíveis e reproduzíveis (Lee et al., 1990; Gazzaz et al., 1992; Wyatt, 1992; Wyatt et al., 1993; AOAC, 2001).

Alguns ensaios imunológicos para detecção de *Salmonella* spp. estão disponíveis comercialmente na forma de kits (AOAC, 2001; Food HACCP, 2001), porém de custo inacessível para a maioria dos laboratórios brasileiros, principalmente para aqueles públicos e oficiais de diagnóstico de toxinfecção alimentar.

A primeira etapa para a padronização de um ensaio é a produção e purificação de anticorpos específicos. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi a produção de anticorpos policlonais específicos para *Salmonella* Enteritidis, com a finalidade de padronização futura de um ensaio imunoenzimático - ELISA sanduíche, para a detecção dessa bactéria em alimentos.

Material e métodos

Esquema de imunização

Coelho branco Nova Zelândia do sexo masculino com peso de 2 a 3 kg foi imunizado com proteína flagelar (flagelina) purificada, gentilmente doada pelo Dr. Gary Wyatt do "Institute of Food Research", IFR Norwich, Inglaterra. A imunização foi realizada de acordo com o preconizado pelo Dr. Gary Wyatt (informação pessoal). Na primeira dose, foram inoculadas 100 µg de flagelina e após 9 dias foi injetada a mesma quantidade de antígeno. Após 70 dias, foi inoculada uma dose de reforço com 300 µg de flagelina. As doses de flagelina foram administradas por injeção subcutânea, distribuídas em três diferentes locais na região dorsal do animal. O adjuvante de Freund completo foi empregado na primeira dose e o incompleto na segunda e terceira doses.

Para o preparo do adjuvante de Freund seguiu-se a fórmula proposta pelo Laboratório de Imunologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, misturando-se 8,5 mL de nujol com 1,5 mL de lanolina. O adjuvante completo foi preparado, adicionando-se à mistura 10 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra avirulenta e liofilizada.

Avaliação do soro

Antes do início da imunização foi realizada uma sangria para obter o soro pré-imune que serviu como controle da resposta imune à flagelina. A resposta foi considerada positiva quando a absorbância do soro imune foi três vezes maior que aquela do soro pré-imune. Para verificar a resposta imune do animal, foi realizada uma coleta de sangue após nove dias da segunda injeção.

O anti-soro imune foi obtido por sangria da veia marginal da orelha ou por punção cardíaca. Após uma semana da dose de reforço, oito coletas foram realizadas semanalmente durante dois meses.

Preparo da suspensão de *Salmonella* Enteritidis em diferentes meios de cultivo

Para a determinação da resposta imune do animal, título e especificidade do anti-soro, suspensões bacterianas de *Salmonella* Enteritidis (Enterobacteriaceae), gentilmente doadas pela Dra. Halha Ostrensky Saridakis, Universidade Estadual de Londrina, Estado do Paraná, Brasil, foram preparadas de acordo com o preconizado por Wyatt et al. (1993), com algumas modificações. Colônias isoladas de *Salmonella* Enteritidis cultivadas em ágar Hektoen foram transferidas para 10 mL de infusão cérebro coração (brain heart infusion - BHI, Biobrás Diagnóstico). Após incubação por duas horas a 37°C, 0,1 mL foram transferidos para novos tubos de plástico e de vidro de diferentes tamanhos contendo 10 mL de BHI, que foram cultivados a 37°C por 18 horas. As células bacterianas foram mortas pelo calor, em banho Maria a 72°C. O tempo de exposição para a morte celular variou com o tipo de tubo utilizado. As células foram centrifugadas a 650 x g por 15 minutos, lavadas três vezes com salina estéril (NaCl 8,5 g/L) e ressuspendidas em salina para ajustar a absorbância a 0,6 em 650 nm.

O mesmo procedimento foi realizado empregando caldo tripticase de soja - TSB (Mikrobiologie), caldo lactosado - CL (Biobrás Diagnóstico), caldo nutriente - CN (Merk) e água peptonada - AP (Biobrás Diagnóstico).

Avaliação da cobertura de microplacas de diferentes procedências

Com a finalidade de padronizar ensaio com maior sensibilidade e reprodutibilidade a cobertura das microplacas foi avaliada em quatro diferentes procedências de microplacas vendidas comercialmente: Nunc PolySorp, Corning, Coster e uma microplaca desmontável de procedência desconhecida. As marcas de microplacas foram

escolhidas pelo preço e disponibilidade no mercado brasileiro.

As microplacas de poliestireno foram revestidas com 100 µL da suspensão de *Salmonella* Enteritidis. Após agitação por 10 min, foram adicionados 50µL de solução de glutaraldeído 0,25%, preparada em tampão fosfato de sódio 0,15M pH 7,4 (PBS) a 4°C. As microplacas foram incubadas por 16 horas a 4°C, lavadas 3 vezes com água purificada em Milli-Q Plus, Millipore e adicionadas de 200 µL de leite desnatado (Molico-Nestlé), 5% em tampão carbonato bicarbonato de sódio 0,05% pH 9,6. Após incubação por 1 hora a 37°C, as microplacas foram lavadas 3 vezes com água purificada e conservadas a 4°C até o uso.

As microplacas revestidas com *Salmonella* Enteritidis foram adicionadas de 100µL, em triplicata, do anti-soro policlonal diluído a 1:100; 1:1.000; 1:10.000; 1: 100.000; 1:1.000.000 em tampão fosfato de sódio 0,15M pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST 0,05%). Após incubação por 1 hora, a 37°C e 5 lavagens com PBST 0,05%, foram adicionados 100 µL de conjugado anti-IgG de coelho ligado à fosfatase (SIGMA Immuno Chemical A - 3687), diluído a 1:1.000 em PBST 0,05%. As microplacas foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C, lavadas 5 vezes com PBST 0,05% e adicionadas de 100 µL do substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma 104-105). O substrato foi preparado com 1 mg/mL, em tampão carbonato 0,1 M, em MgCl₂ 1mM, pH 9,6. Após 30 minutos de incubação a 37°C, a reação enzimática foi interrompida com 100 µL de NaOH 2 M, e a absorbância lida a 405 nm.

Avaliação do título do anti-soro

As microplacas Nunc PoliSorp revestidas com *Salmonella* Enteritidis, conforme especificado na avaliação da cobertura de microplacas de diferentes procedências, foram utilizadas para a avaliação do título do anti-soro. A diluição na qual a absorbância foi de 1,0 a 2,0 a 405 nm, após 30 minutos de reação com o substrato, foi considerada como o título do anti-soro.

Avaliação da especificidade do anti-soro produzido

Para a avaliação das reações cruzadas, utilizaram-se suspensões de *Salmonella* Enteritidis (doação da Dra. Halha Ostrensky Saridakis, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil), *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Typhimurium (sorotipos obtidos no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil), *Citrobacter freundii*,

Enterobacter aerogenes, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii* e *Proteus mirabilis* (doados pelo Prof. Francisco Herrero, Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná, Brasil).

As microplacas de poliestireno (NUNC-PolySorp) foram revestidas, conforme metodologia descrita para cobertura das microplacas, utilizando 100 µL das diferentes suspensões bacterianas. Para o cálculo da porcentagem de reação cruzada, foi utilizada a diluição do anticorpo correspondente à metade da absorbância obtida com a suspensão de *Salmonella* Enteritidis. Esse valor foi dividido pela diluição do anticorpo obtido com cada uma das suspensões de enterobactérias e dos outros sorotipos de *Salmonella* testados. Para os cálculos da porcentagem de reação cruzada, empregaram-se curvas de regressão linear, realizadas no programa MicroCal Origen 3.01 da MicroCal Software. Os testes foram realizados três vezes em triplicata.

Portanto as porcentagens de reação cruzada foram obtidas para todas as bactérias testadas da seguinte maneira exemplificada para *Salmonella* Typhimurium:

Fórmula das curvas de regressão linear $Y = a + bx$

Salmonella Enteritidis $Y = 0,26382 + 1754,93205x$

Salmonella Typhimurium $Y = 0,10884 + 339,90192x$

A absorbância máxima para *Salmonella* Enteritidis foi de 2,019, cuja metade é 1,0095

$$\text{Portanto: } x = \frac{y - a}{b}$$

Então para *Salmonella* Enteritidis

$$x_1 = \frac{1,0095 - 0,26382}{1754,93205}$$

$$x_1 = 0,00042491$$

E para *Salmonella* Typhimurium

$$x_2 = \frac{1,0095 - 0,10884}{339,90192}$$

$$x_2 = 0,00264976$$

% de reação cruzada = $x_1 / x_2 \times 100$

16,03% de reação cruzada de *Salmonella* Typhimurium

Resultados e discussão

Produção de anticorpos policlonais antiflagelina de *Salmonella* Enteritidis

Anticorpos policlonais foram produzidos em coelho imunizado com flagelina pura de *Salmonella* Enteritidis. A resposta sorológica, após uma semana da administração da dose de reforço, apresentada na

Figura 1, foi melhor nas cinco primeiras semanas, caindo progressivamente nas três últimas coletas. O soro pré-imune apresentou absorvância (0,4375) no mínimo três vezes menor que aquela observada no soro após a dose de reforço, indicando resposta adequada do animal.

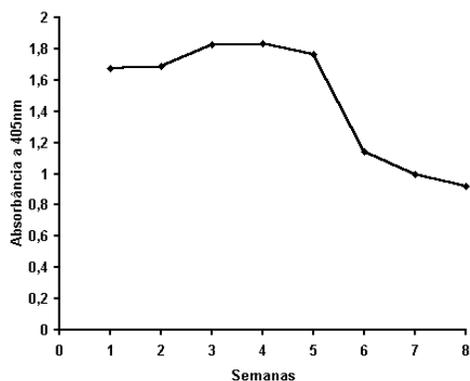


Figura 1. Resposta sorológica do coelho imunizado com flagelina de *Salmonella* Enteritidis, após 1 semana da dose de reforço (300µg), administrada 90 dias da primeira dose de imunização

A Figura 2 apresenta a titulação do soro anti-flagelina bruto, realizada através do método ELISA empregando anti-IgG de coelho ligada à fosfatase. O título foi de 1:10.000, já que, esta diluição forneceu uma média de absorvância a 405nm entre 1,0 e 2,0, após 30 minutos de reação com o substrato. Entretanto, esse título não se manteve constante durante todo o trabalho. Esse fato pode ser devido à variação das suspensões de *Salmonella* Enteritidis.

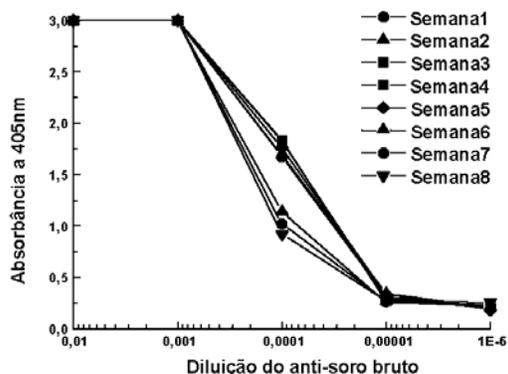


Figura 2. Titulação do soro bruto anti-flagelina para *Salmonella* Enteritidis, realizada através do método de ELISA, empregando anti-IgG de coelho ligada a fosfatase

Um dos poucos trabalhos publicados que especificam o sistema de imunização e doses de reforço para a produção de anticorpos policlonais para *Salmonella* sp. foi publicado por Ibrahim et al.

(1985c). O sistema de imunização empregado por esses autores utilizou duas doses de 50 µg de flagelina purificada (Ibrahim et al., 1985b) inoculadas, intradermicamente, em vários pontos do dorso do animal, num intervalo de 110 dias. O adjuvante de Freund completo foi utilizado na primeira dose e o incompleto na dose de reforço.

Posteriormente, Ibrahim e Lyons (1987) determinaram o título do anti-soro produzido por Ibrahim et al. (1985a) que foi de 1:4000, inferior ao encontrado neste trabalho (1:10.000). Essa diferença pode ser devida à quantidade total de flagelina utilizada por esses autores (100 µg), que foi muito menor à utilizada no presente trabalho (500 µg). Além disso, o longo intervalo entre a primeira injeção e a dose de reforço utilizada por Ibrahim et al. (1985a) pode ter influenciado na resposta imune dos animais e, conseqüentemente, no título do anti-soro. Outra possível explicação seria a variação das suspensões de *Salmonella* Enteritidis utilizadas no presente trabalho.

A maioria dos trabalhos publicados relatando a produção de anticorpos policlonais para *Salmonella* spp. não especificam o sistema de imunização ou doses de reforço empregados na obtenção de anti-soro. A pouca disponibilidade de informação sobre esses sistemas de imunização dificulta a escolha de intervalos de imunização, assim como das quantidades de antígeno a serem usadas (Lee et al., 1990; Wyatt et al., 1993; AOAC, 1995). Entretanto, neste trabalho foi empregado o esquema de imunização detalhado em comunicação pessoal pelo Dr. Gary Wyatt, com o qual foi possível obter um título apropriado.

Padronização das suspensões de *Salmonella* Enteritidis

O uso de suspensões bacterianas, durante a análise dos anti-soros, exige confirmação da morte celular. Entretanto, o tempo e a temperatura usados devem ser controlados para não afetar a integridade do flagelo. O tratamento térmico em banho Maria a 72°C por 15 minutos, utilizado neste trabalho e indicado por Wyatt et al. (1993), apresentou a eficácia necessária quando alguns detalhes importantes foram considerados: (1) O crescimento celular foi controlado com uma diluição prévia do inóculo em BHI conforme descrito no preparo da suspensão de *Salmonella* Enteritidis, pois um excessivo número de bactérias impossibilitava a morte celular a 72°C, após 15 minutos. (2) O nível da água no banho Maria em relação ao tubo foi de no mínimo 6cm acima do nível da suspensão bacteriana (em 10 mL de BHI),

pois níveis mais baixos de água não foram efetivos para a destruição das células. (3) O tempo necessário para a morte bacteriana foi de 15 minutos após o centro do tubo atingir a temperatura de 72°C, tendo sido de 3 minutos quando tubos de vidro 15 x 140mm foram utilizados. Tubos de vidro de menor diâmetro não foram eficientes porque o nível da água do banho Maria não atingia o mínimo de 6cm acima da suspensão celular. Tubos plásticos também não foram adequados, porque a temperatura interna dos tubos não atingia 72°C, mesmo após duas horas de aquecimento, não ocorrendo morte bacteriana.

Teo *et al.* (1996) avaliaram o efeito sinérgico da temperatura e do pH elevados na destruição de *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* O:157H:7. Esses autores constataram que a destruição dos microrganismos era obtida quando eram utilizados pH de 10 ou 11, temperaturas de 40 a 65°C e nível da água do banho Maria 5 cm acima do ponto no tubo no qual a temperatura era medida. Com níveis menores, não ocorreu a morte celular nas temperaturas e pH testados. Esses resultados comprovam o observado no presente trabalho em relação à importância do nível da água do banho Maria na destruição térmica de suspensões bacterianas.

Especificidade do soro antiflagelina para *Salmonella* Enteritidis e porcentagem de reação cruzada com outras enterobactérias

Entre as quatro diferentes microplacas vendidas comercialmente, as superfícies da marca Nunc PoliSorp apresentaram melhor adsorção do antígeno à microplaca, como pode ser observado na Figura 3. As microplacas Nunc Polisorp apresentam, predominantemente, grupos hidrofóbicos e são utilizadas quando antígenos lipoprotéicos ou lipídicos são adsorvidos à fase sólida. Para melhorar a

adsorção foram necessárias a agitação das microplacas e a adição de glutaraldeído (Nalge Nunc International, 1997).

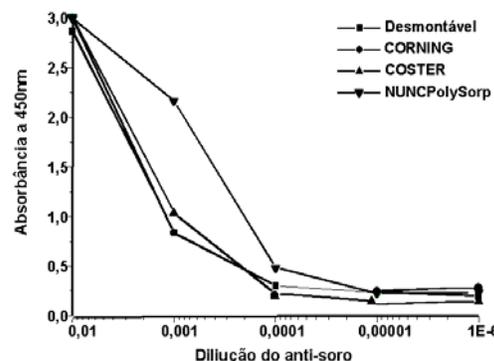


Figura 3. Avaliação da cobertura de microplacas de diferentes procedências com 100µL da suspensão de *Salmonella* Enteritidis

As porcentagens de reações cruzadas, os valores de regressões lineares e coeficiente de correlação calculados para cada bactéria testada encontram-se na Tabela 1. As curvas de regressões lineares estão apresentadas na Figura 4. A reação cruzada do anticorpo policlonal revelou que o soro é específico para *Salmonella* Enteritidis (Tabela 1). O anti-soro apresentou pouca reação cruzada com os três sorotipos de *Salmonella* testados, ou seja, 16,0 com *Salmonella* Typhimurium, 11,9 com *Salmonella* Infantis e 6,4 com *Salmonella* Newport. As enterobactérias testadas apresentaram porcentagens de reação cruzada menores, quando comparadas com os sorotipos de *Salmonella* testados. *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* apresentaram as maiores reações cruzadas, com porcentagens de 7,0, 7,1 e 5,7%, respectivamente.

Tabela 1. Porcentagem de reação cruzada do anticorpo policlonal anti-flagelina de *Salmonella* Enteritidis com as enterobactérias e sorotipos de *Salmonella* estudadas através de regressão linear

Enterobactérias	Y* = a + b x	Coefficiente de correlação†	Valores de X ₂	% de reação cruzada (x ₁ /x ₂ *100)
<i>S. Enteritidis</i>	Y = 0,26382 + 1754,93205x ₁	0,999	0,00042491	100,0
<i>C. freundii</i>	Y = 0,0793 + 63,69733x ₂	0,972	0,01460344	2,9
<i>E. aerogens</i>	Y = 0,06806 + 73,60794x ₂	0,988	0,01278992	3,3
<i>E. cloacae</i>	Y = 0,05916 + 49,82889x ₂	0,999	0,01907207	2,2
<i>E. coli</i>	Y = 0,07908 + 152,71323x ₂	0,996	0,00609260	7,0
<i>K. pneumoniae</i>	Y = 0,08266 + 154,25274x ₂	0,999	0,00600858	7,1
<i>M. morgani</i>	Y = 0,09268 + 35,35106x ₂	0,963	0,02593472	1,6
<i>P. mirabilis</i>	Y = 0,20296 + 108,16359x ₂	0,986	0,00745667	5,7
<i>S. Infantis</i>	Y = 0,1296 + 246,27069x ₂	0,994	0,00357290	11,9
<i>S. Newport</i>	Y = 0,11399 + 134,13324x ₂	0,992	0,00667627	6,4
<i>S. Typhimurium</i>	Y = 0,10884 + 339,90192x ₂	0,992	0,00264976	16,0

*Y = 1,0095 (metade da absorbância máxima para *Salmonella* Enteritidis 2,019 / 2); x₁ = valor de x para *Salmonella* Enteritidis, 0,00042491; x₂ = valor de x calculado pela regressão linear para cada bactéria; † Em 3 repetições em triplicata

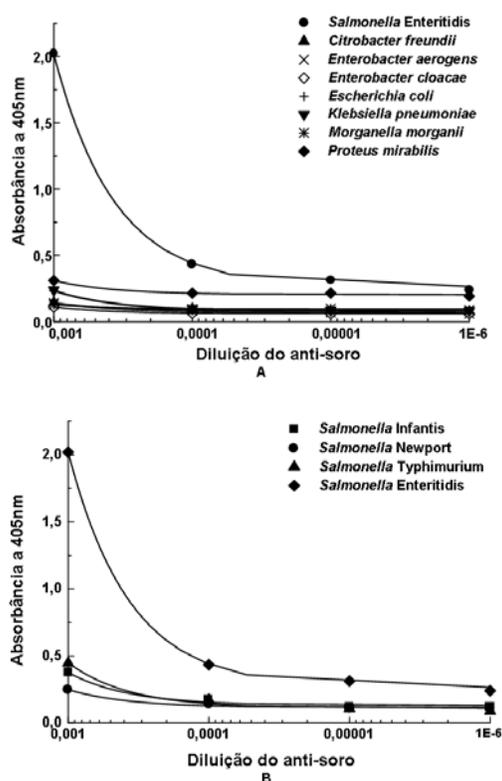


Figura 4. Curvas de diluição do soro anti-flagelina, empregadas no cálculo das porcentagens das reações cruzadas. **A** - Curva da *Salmonella* Enteritidis frente ao grupo das enterobactérias. **B** - Curva da *Salmonella* Enteritidis frente aos 3 sorotipos de *Salmonella*. Ensaio realizado com 3 repetições em triplicata

A existência de antígenos flagelares e somáticos comuns a diferentes bactérias foi reportado por Ibrahim *et al.* (1985c), que demonstraram a existência de relações imunológicas entre os antígenos de superfície das salmonelas, como também de outras enterobactérias. Lee *et al.* (1990) padronizaram ELISA sanduíche para detecção de *Salmonella* Typhimurium em alimentos empregando flagelina como antígeno na produção de anticorpos policlonais. Esses autores obtiveram anti-soro com porcentagens de reação cruzada de 32% para *Salmonella* Hadar, de 30% para *Salmonella* Weltevreden, de 20% para *Salmonella* Agona e de 10% para *Salmonella* Enteritidis. Essas porcentagens de reação cruzada são, em geral, maiores que aquelas encontradas neste trabalho.

Maiores porcentagens de reação cruzada são encontradas quando são produzidos anticorpos contra o lipopolissacarídeo (LPS) ou as fimbrias. A flagelina tem sido reportada como um dos melhores antígenos a serem utilizados na produção de anti-soro, tanto para triagem sorológica como para a padronização de ensaios imunoenzimáticos. Assim,

Ibrahim e Lyons (1987) encontraram bons resultados quando padronizaram ensaios para a detecção de *Salmonella* em alimentos empregando flagelina como antígeno na produção de anticorpos policlonais. Nicolas e Cullen (1991) padronizaram ELISA para a triagem sorológica de aves, empregando anticorpos policlonais para o LPS de *Salmonella* Enteritidis. O ensaio apresentou reações cruzadas com outros sorotipos de *Salmonella* e, esse fato, provavelmente, ocorreu devido ao antígeno somático 12, que está presente nos sorogrupos B e D1 (Hassan *et al.*, 1990; Nicolas e Cullen, 1991).

Baay e Huis in't Veld (1993) constataram que reações cruzadas ocorreram com vários sorotipos de *Salmonella* quando o LPS foi utilizado no preparo do anti-soro. Porém não foram observadas reações cruzadas com os antígenos flagelares. O mesmo ocorreu com Hassan *et al.* (1990) e Timoney *et al.* (1990), que também utilizaram antígenos flagelares. Os dados apresentados e os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o melhor antígeno para a produção de anti-soro é a flagelina, principalmente, se os anticorpos forem policlonais.

Avaliação dos resultados obtidos após o preparo de suspensões de *Salmonella* Enteritidis em diferentes meios de cultura

Após a análise dos resultados obtidos neste trabalho é importante destacar a variação de absorbância observada no decorrer dos experimentos. Na Figura 4 observa-se claramente que a diluição do anti-soro ficou entre 1:1000 e 1:5000, enquanto que, na Figura 2 a diluição foi de 1:10.000. Experimentos realizados utilizando suspensões de *Salmonella* Enteritidis preparadas em diferentes meios indicaram que dependendo do meio o título do anti-soro pode variar. Na Figura 5 estão representadas as absorbâncias encontradas com as suspensões de *Salmonella* Enteritidis com absorbância de 0,6 a 650 nm, preparadas nos seguintes meios: caldo infusão cérebro coração - BHI, caldo tripticase de soja - TSB, caldo lactosado - CL, caldo nutriente - CN e água peptonada - AP.

Nos meios TSB e AP, as absorbâncias a 405nm foram de 0,380 e 0,574, respectivamente. Essas absorbâncias estão abaixo dos valores entre 1,0 e 2,0 utilizados na determinação do título do anti-soro. Com os meios BHI, CL e CN foram obtidas absorbâncias entre 1,0 e 2,0, sendo maiores com o caldo nutriente - CN, seguido do BHI e do CL com absorbâncias de 2,050, 1,517 e 1,035, respectivamente (Figura 5). Segundo esses resultados, o caldo nutriente seria o melhor meio a ser utilizado no preparo das suspensões de *Salmonella*

Enteritidis. Porém, neste trabalho, optou-se pelo BHI porque com o caldo nutriente o tempo de incubação foi de 48 horas para a obtenção de inóculo, semelhante ao obtido com o BHI incubado por 24 horas.

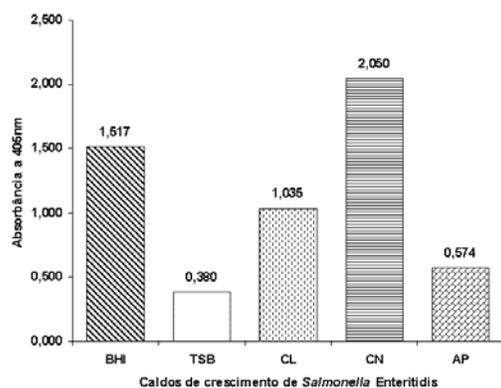


Figura 5. Absorbâncias encontradas com as suspensões de *Salmonella* Enteritidis (0,6 a 650nm), em relação ao meio de cultura utilizado. BHI - infusão cérebro coração, TSB - caldo tripticase de soja, CL - caldo lactosado, CN - caldo nutriente, AP - água peptonada

Experimentos efetuados por Lee *et al.* (1990) com caldo M, caldo M modificado e meio SCDM indicaram que os resultados obtidos foram melhores quando o meio SCDM foi usado. Por outro lado, Wyatt *et al.* (1993) encontraram que suspensões preparadas no meio SCDM ou BHI apresentaram resultados equivalentes. Neste trabalho foi usado o meio de BHI, que, além de ser facilmente encontrado no comércio, foi adequado para o preparo das suspensões bacterianas.

Hongsheng *et al.* (1999) encontraram que o uso de BHI como meio de pós-enriquecimento aumentava os títulos no ELISA, quando comparados com o caldo nutriente, e concluíram que o tipo de meio de cultura pode ter um efeito significativo nos resultados do ELISA.

As diferentes fases do crescimento celular ou a variação na expressão flagelar ou somática pode ocorrer quando *Salmonella* cresce no ágar Hektoen (Guard-Petter, 1997). As variações na absorbância com suspensões de *Salmonella* Enteritidis, preparadas em BHI em dias diferentes e, conseqüentemente, no título do anti-soro (Figuras 2 e 4), provavelmente podem ser devidas ao uso do ágar Hektoen. Esse meio foi usado no presente trabalho para o isolamento de colônias, antes do crescimento em BHI. Guard-Petter (1997) reportou, ainda, que o ágar Hektoen pode induzir o desenvolvimento de células de *Salmonella* Enteritidis na fase rugosa,

devido à expressão de antígenos LPS de cadeia-longa, bem como a motilidade em isolados de *Salmonella* Pullorum, particularmente na presença de glicose.

Por outro lado, Chart e Rowe (1998), demonstraram que o ágar Hektoen não afetou a expressão dos antígenos flagelar e somático durante experimentos desenvolvidos com 12 isolados de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Pullorum. Portanto, existe divergência em relação à influência do ágar Hektoen na expressão desses antígenos.

A expressão flagelar também pode ser influenciada pelo estresse provocado pelo meio ambiente, o que influenciaria diretamente na performance do ELISA. Walker *et al.* (1999) estudaram o efeito do pH, da temperatura e da superfície de contato na elaboração de fímbrias e flagelos por isolados de *Salmonella* Enteritidis. Os autores observaram que a presença das fímbrias SEF14 e SEF17 dependeu da temperatura e do pH em que os isolados de *Salmonella* foram cultivados. O crescimento a 37°C induziu a formação de flagelos menores que aqueles encontrados na incubação a 20°C e, particularmente, em meios com pH entre 4,04 e 4,65 nas referidas temperaturas. O desenvolvimento de células hiperflageladas foi observado em *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis e dependeu da concentração de ágar, temperatura e fonte de carbono disponível. Esses resultados mostraram que o meio e as condições de incubação influenciam, principalmente, a formação de flagelo ou fímbria.

A diferença entre os resultados obtidos neste trabalho com suspensões de *Salmonella* preparadas em BHI, em dias diferentes, alerta para a necessidade de se avaliar os meios de cultura e temperatura de incubação empregados no preparo de suspensões de *Salmonella* spp. utilizadas como padrão. Além disso, avaliar os diferentes meios utilizados no pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e pós-enriquecimento para a análise de alimentos.

Concluindo, pôde-se verificar que o esquema de imunização empregado neste trabalho permitiu a obtenção de anti-soro policlonal para *Salmonella* Enteritidis específico. A avaliação das reações cruzadas mostrou que o anti-soro tem pouca reação cruzada com os sorotipos Typhimurium, Infantis e Newport, como, também, com outras enterobactérias testadas, indicando a possibilidade de sua aplicação na padronização futura de ensaios imunológicos para detecção de *Salmonella* Enteritidis em alimentos. Os diferentes meios de cultura

podem ter um efeito significativo nos resultados do ELISA.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes através do Programa de Estudantes de Convênio de Pós Graduação - PEC-PG pela concessão de bolsa de mestrado à M.Sc. Iliana Alcocer; assim como à equipe do Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina pela colaboração na parte experimental.

Referências

- AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16.ed. Virginia: AOAC, 1995. Cap.17, p. 55-95.
- AOAC, 2001 [on line] disponível na internet via www uel: <http://www.aoac.org/testkits/microbiologykits.htm>. Arquivo capturado em 6 de novembro de 2001.
- BAAV, M.F.D.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella enteritidis* in poultry. *J. Appl. Bacteriol.*, Oxford, v.74, p.243-247, 1993.
- BLAIS, B.W. et al. Polymacron enzyme immunoassay system for detection of naturally contaminating *Salmonella* in foods, feeds, and environmental samples. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.61, n.9, p.1187-1190, 1998.
- CAMARGO, N.J. et al. *Surtos de doenças transmitidas por alimentos em 1998*. Curitiba: Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária, 1999.
- CHART, H.; ROWE, B. Growth of *Salmonella enteritidis* and *S. pullorum* on Hektoen agar and the expression of lipopolysaccharide or flagella. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.163, p.181-184, 1998.
- D'AOUST, J.Y. *Salmonelas e Salmoneloses de origem Alimentar*. São Paulo: Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental., 1997.
- FERRETTI, R. et al. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington D.C., v.67, p.977-978, 2001.
- FOODHACCP, 2001 [on line] disponível na internet via www uel: <http://www.foodhaccp.com/d2.html>. Arquivo capturado em 6 de novembro de 2001.
- GAZZAZ, S.S. et al. Application of immunochemical assays to food analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, Boca Raton, v.32, n.3, p.197-229, 1992.
- GUARD-PETTER, J. Induction of flagellation and a novel agar-penetrating flagellar structure in *Salmonella enterica* grown on solid media: possible consequences for serological identification. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v.149, p.173-180, 1997.
- HANAI, K. et al. Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of *Salmonella* strains in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington D.C., v.63, n.2, p.775-778, 1997.
- HASSAN, J.O. et al. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. *Vet. Rec.*, London, v.126, n.21, p.519-522, 1990.
- HONGSHENG, H. et al. Evaluation of culture enrichment procedures for use with *Salmonella* detection immunoassay. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.51, n.2/3, p.85-94, 1999.
- IBRAHIM, G.F. et al. Production of potent *Salmonella* H antisera by immunization with polymeric flagellins. *J. Clin. Microbiol.*, Washington D.C., v.22, n.3, p.347-351, 1985a.
- IBRAHIM, G.F. et al. Method for isolation of highly purified *Salmonella* flagellins. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.22, n.6, p.1040-1044, 1985b.
- IBRAHIM, G.F. et al. Immunological relationships between *Salmonella* flagelina and between these and flagellins from other species of Enterobacteriaceae. *Med. Microbiol. Immunol.*, Berlin, v.174, p.87-99, 1985c.
- IBRAHIM, G.F.; LYONS, M.J. Detection of *Salmonellae* in foods with an enzyme immunometric assay. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.50, n.1, p.5-61, 1987.
- KAKU, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no Nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saude Publica*, São Paulo, v.29, n.2, p.127-131, 1995.
- KEITH, M. Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of salmonellae in foods. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.60, n.6, p.682-685, 1997.
- LEE, H.A. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington D.C., v.56, n.6, p.1541-1546, 1990.
- MICHALSKI, C.B. et al. Use of capillary tubes and plate heat exchanger to validate U.S. department of Agriculture pasteurization protocols for elimination of *Salmonella* Enteritidis from liquid eggs products. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.62, n.2, p.112-117, 1999.
- MIYAMOTO, T. et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis for detection of *Salmonella* spp. in foods. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.61, n.7, p.785-791, 1998.
- NALGE NUNC INTERNATIONAL. *Principles in adsorption to polystyrene*. Bulletin 6, p. 1-8, 1997.
- NICOLAS, R. A. H.; CULLEN, G. A. Development and application of an ELISA for detecting antibodies to *Salmonella enteritidis* in chicken flocks. *Vet. Rec.*, London, v.128, n.4, p.74-76, 1991.
- TEO, Y. et al. Synergistic effect of high temperature and high pH on the destruction of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O:157: H7. *J. Food Prot.*, Des Moines, v.59, n.10, p.1023-1030, 1996.
- THORNS, C.J. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev.-Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, Paris, v.19, n.1, p.226-239, 2000.

TIMONEY, J.F. *et al.* Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* by a g, m flagellin-based ELISA. *Vet. Rec.*, London, v.127, n.7, p.168-169, 1990.

WALKER, S.L. *et al.* Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype Enteritidis. *J. Med. Microbiol.*, London, v.48, n.3, p.253-261, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. [on line] disponível na internet via www uel: <http://www.who.int>. Arquivo capturado em 17/05/01.

WYATT, G.M. *Immunoassays for food poisoning bacteria and bacterial toxins*. London: Chapman & Hall, 1992.

WYATT, G.M. *et al.* Further studies on the feasibility of one-day *Salmonella* detection by enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington D.C., v.59, n.5, p.1383-1390, 1993.

Received on December 21, 2001.

Accepted on May 06, 2002