

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0610781-8 A2**

(22) Data de Depósito: 24/04/2006
(43) Data da Publicação: 09/11/2010
(RPI 2079)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/569
G01N 33/543

(54) Título: **MÉTODOS PARA IMOBILIZAR UM POLISSACARÍDEO SOBRE UM CARREADOR, PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE UM ANTICORPO DIRECIONADO PARA UM ANTÍGENO DE UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA EM UMA AMOSTRA, E PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA EM UMA AMOSTRA, CARREADOR, COLEÇÃO DE MICROESFERAS OU DE GLÓBULOS, BIOSENSOR, E, SISTEMA DE DETECÇÃO POR RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE**

(30) Prioridade Unionista: 22/04/2005 EP 05075967.9

(73) Titular(es): RNA HOLDING B. V.

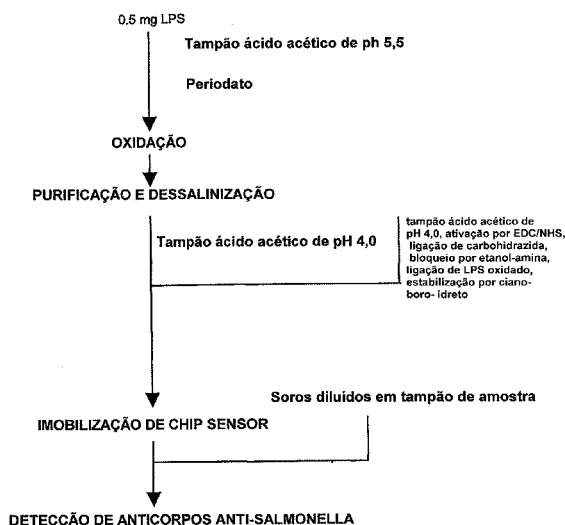
(72) Inventor(es): ALDERT ANTHONIE BERGWERFF, BERTHA GERARDA MARIA GORTEMAKER, GERTRUDA CORNELIA ANTONIA MARIA BOKKEN

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT NL2006000218 de 24/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/112708 de 26/10/2006

(57) Resumo: METODOS PARA IMOBILIZAR UM POLISSACARÍDEO SOBRE UM CARREADOR, PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE UM ANTICORPO DIRECIONADO PARA UM ANTÍGENO DE UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA EM UMA AMOSTRA, E PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA EM UMA AMOSTRA, CARREADOR, COLEÇÃO DE MICROESFERAS OU DE GLÓBULOS, BIOSENSOR, E, SISTEMA DE DETECÇÃO POR RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE A invenção refere-se ao campo da química e da diagnose, mais em particular à diagnose de infecções correntes e/ou passadas e/ou assintomáticas ou de uma história de exposição a uma bactéria gram-negativa (tal como uma Enterobacteriaceae ou uma Legionella). Ainda mais particularmente, a invenção refere-se à seleção de animais ou de produtos animais para a presença de microorganismos indesejados /não desejados. A invenção adicionalmente refere-se a um método para selecionar amostras para a presença de anticorpos direcionados contra microorganismos indesejados /não desejados e preferivelmente um tal método é realizado com o auxílio de um biossensor. A invenção também se refere a um método para imobilizar polissacarídeos em superfícies sólidas. A invenção adicionalmente proporciona superfícies sólidas com polissacarídeos imobilizados bem como aplicações de tais superfícies.



“MÉTODOS PARA IMOBILIZAR UM POLISSACARÍDEO SOBRE UM CARREADOR, PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE UM ANTICORPO DIRECIONADO PARA UM ANTÍGENO DE UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA EM UMA AMOSTRA, E PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA EM UMA AMOSTRA, CARREADOR, COLEÇÃO DE MICROESFERAS OU DE GLÓBULOS, BIOSSENSOR, E, SISTEMA DE DETECÇÃO POR RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE”

A invenção refere-se ao campo da química e da diagnose, mais particularmente à diagnose de infecções correntes e/ou passadas e/ou assintomáticas ou de uma história de exposição a uma bactéria gram-negativa (tal como uma *Enterobacteriaceae* ou uma *Legionella*). Ainda mais particularmente, a invenção refere-se à seleção de animais ou de produtos animais para a presença de microorganismos indesejados / não-desejados. A invenção adicionalmente refere-se a um método para seleção de amostras para a presença de anticorpos direcionados contra microorganismos indesejados / não-desejados e preferivelmente um tal método é realizado com o auxílio de um biossensor. A invenção também se refere a um método para imobilização de polissacarídeos em superfícies sólidas. A invenção adicionalmente proporciona superfícies sólidas com polissacarídeos imobilizados bem como aplicações de tais superfícies.

O mundo está cheio de bactérias gram-negativas, muitas das quais são membros da família *Enterobacteriaceae*. Membros desta família são encontrados no trato gastrointestinal de animais, mas muitos também estão vivendo livremente no solo e na água. Membros da família *Enterobacteriaceae* possuem estruturas antigênicas muito complexas. Além disso, compreendem múltiplos antígenos que são identificados como antígenos K, antígenos H, e antígenos O. O antígeno K é a cápsula de polissacarídeo ácido. A cápsula possui muitas funções incluindo evasão do

sistema imune do hospedeiro infectado e adesão no epitélio do hospedeiro. O antígeno H está localizado sobre os flagelos.

A porção externa da parede celular em bactérias gram-negativas é principalmente composta de lipopolissacarídeos (LPS). LPS é composto de lipídeo A que está enterrado dentro da membrana externa, um núcleo de carboidrato curto e opcionalmente uma cadeia de polissacarídeos que é composta de unidades repetidas. Os antígenos O estão localizados sobre o polissacarídeo. Lipídeo A é o constituinte tóxico do LPS. À medida que a célula lisa, LPS é liberado, acarretando febre e consumo de complemento. Também interfere na coagulação e em concentrações altas eventualmente ocasiona um estado de choque.

Como um exemplo não-limitante um membro das *Enterobacteriaceae*, *Salmonella*, será discutido com mais detalhe. Um grande número de subespécies dos gêneros *Salmonella enterica* são bactérias patogênicas importantes para humanos e animais. Além do fato de que os animais entram em um episódio patológico, os animais podem ser veículos assintomáticos das bactérias. Animais contaminados podem ser uma fonte destes patógenos ameaçadores da saúde pública por exemplo por intermédio do alimento que estes animais produzem. Visto que muitos financiadores consideram inaceitável o número de infecções causadas por *Salmonella* proveniente de alimento, medidas têm que ser tomadas para conter este patógeno na cadeia alimentar.

Salmonella é a significância maior como um microorganismo patogênico em infecções provenientes de alimento em humanos, causando efeitos clínicos brandos a severos. Nos Países-Baixos, 5% de todos os casos identificados de gastroenterite é salmonelose (Edel et al., 1993; Hoogenboom Verdegaaal et al., 1994). A incidência média desta infecção é 450 casos por 100.000 pessoas por ano sob risco, que é similar àquela em países industrializados (Berends et al., 1998). Não obstante os 2.480 sorotipos

identificados no grupo de *S. enterica* até 2001 (Popoff, 2001), apenas um número pequeno tem estado envolvido em infecções de humano (Grimont et al., 2000). *Salmonella typhimurium* mais *Salmonella enteritidis* representaram >75% de todos os isolados de *Salmonella* das fontes humanas enviadas ao Dutch National Salmonella Centre at the RIVM em 2002 (Van Pelt et al., 2003). Esta percentagem consistida de 51% é proveniente do contato com produtos de galinha (ave doméstica 15%; ovos 36%) (Van Pelt et al., 2003).

Detecção de imunoglobulinas nos fluidos corporais de organismos (sorologia) é um modo de estabelecer uma história de exposição de animais e humanos aos agentes infecciosos. Uma resposta humoral contra antígenos de *Salmonella* pode ser detectada em galinhas 1 semana após a infecção e persiste por pelo menos 10 semanas até mesmo de a ave não for mais cultura-positiva (Holt, 2000). Os determinantes antigênicos de *Salmonella* são, como descrito acima, compostos de antígenos somático (O), flagelar (H) e superficial (Vi) (Holt, 2000). Variações na composição de antígenos correlacionam-se com sorotipos diferentes de *Salmonella*.

Tipicamente, sorologia é mais rápida do que tipificação de cultura do organismo causador de doença. Detecção rápida e específica de rebanhos e manadas é de importância com o propósito de se tomarem medidas adequadas em processos de produção. A detecção de anticorpos em amostras de soro e de sangue de animais produtores de alimento relatando a presença de patógenos zoonóticos é portanto de significância. Tal informação é então usada como a entrada para a avaliação de risco com o objetivo de se ser capaz de aumentar a segurança de alimento, mas também para melhorar os perigos ocupacionais e para reduzir a disseminação de patógenos no ambiente.

Numerosos testes sorológicos têm sido desenvolvidos para a detecção de espécie *Salmonella* invasiva. Dentre muitos de tais métodos, aglutinação e ELISA têm sido mais comumente usados (Barrow, 2000). Testes de aglutinação têm sido usados bem sucedidamente para erradicar

Salmonella pullorum de bandos de aves domésticas. Contudo, a abordagem é enfadonha, laboriosa e inadequada para programas de triagem de grande escala de acordo com os padrões modernos. Vários procedimentos de ELISA que são considerados relativamente baratos e rápidos, têm sido portanto desenvolvidos para detecção de respostas anti-antígeno de *S. enteritidis* e de *S. typhimurium* em soros de aves domésticas (Barrow et al., 1996; Thorns et al., 1996; de Vries et al., 1998; Barrow, 2000; Yamane et al., 2000).

O uso de biossensores também promete ser bem sucedido, barato e rápido nesta área de análise. Em adição, a técnica é capaz de detectar múltiplos analitos de qualquer tipo biomolecular em uma única corrida. Um biossensor é definido como um dispositivo analítico consistindo de (i) um ligante biológico imobilizado reutilizável que ‘sente’ o analito, e (ii) um transdutor físico, que traduz este fenômeno em um sinal eletrônico.

O fenômeno de ressonância de plasmon de superfície (SPR) foi primeiro reconhecido no início dos anos 1960s (Kretschmann e Raether, 1968) e os primeiros biossensores de SPR foram introduzidos nos anos 1980s (Liedberg et al., 1983). Demorou até o final dos anos 1980s e início dos anos 1990s antes que o primeiro equipamento de biossensor baseado em SPR comercialmente disponível fosse lançado no mercado. Inicialmente, este tipo de biossensor atraiu o interesse de companhias farmacêuticas como uma ferramenta secundária para a triagem *in vitro* tanto seletiva quanto sensitiva de produtos farmacêuticos novos promissores de bibliotecas combinatórias. Mostrou-se ser uma alternativa valiosa às abordagens clássicas tais como os procedimentos de ELISA. Além disso, oferece uma medição em tempo-real do evento de ligação em contraste com as determinações de ponto-final. Os benefícios desta abordagem analítica também têm sido reconhecidos por muitas outras disciplinas da ciência da vida, incluindo as ciências de alimento (Ivnitski et al., 1999; Medina, 1997). Até agora, apenas umas poucas publicações sobre a biossensação por SPR têm se referido à detecção de

microorganismos patogênicos, por exemplo o uso de células de *Escherichia coli* O157:H7 imobilizadas para selecionar o desempenho de anticorpos anti-*E. coli* O157:H7 (Medina et al., 1997), e o uso destes anticorpos para detectar células de *E. coli* O157:H7 (Fratamico et al., 1997).

5 Em Jongerius-Gortemaker et al. (2002) foi iniciado um estudo para a adequabilidade de um biossensor óptico por SPR para detectar anticorpos em soro e sangue indicando uma reação humoral à invasão com *Salmonella* sorotipos *enteritidis* e *typhimurium*. Neste estudo, foi feito uso de proteínas de fusão de antígeno flagelar imobilizadas. Após análise completa é
10 concluído que a sensibilidade e/ou a robustez deste sistema não foram suficientes e em particular não para triagem de rendimento alto de por exemplo aves domésticas na linha de matança em um abatedouro, processando animais em uma velocidade de vários milhares por hora.

 O objetivo da presente invenção é proporcionar um método
15 que possui uma sensibilidade melhorada e/ou uma robustez melhorada. Este objetivo tem sido alcançado pelo desenvolvimento de um suporte com antígenos somáticos ou denominados O imobilizados. Como descrito, os antígenos O estão localizados sobre os lipopolissacarídeos e a composição do polissacarídeo varia e corresponde ao sorovar da (sub)espécie de *Salmonella*.
20 Cada sorotipo pode, dentre outros, ser descrito por numerosos antígenos O e são tipicamente codificados com um número, tal como O4, O6 ou O12. Os antígenos O podem ser encontrados como unidades repetidas sobre a parte de polissacarídeo do LPS. O comprimento do polissacarídeo também varia e pode estar entre zero (LPS rugoso) e mais do que 50 unidades repetidas
25 (LPSD liso).

 Dentro da família de *Salmonella enterica*, podem ser distinguidos sorogrupos diferentes; cada grupo compreende pelo menos um antígeno O específico. Os sorovares de *Salmonella* de importância em galinhas e porcos são listados com seu perfil de antígeno O na Tabela 1. Em

Dinamarca, Alemanha, Grécia e Países-Baixos, 39,5% de todos os porcos *Salmonella*-positivos amostrados no abatedouro foram determinados como *S. typhimurium*. Dependendo do país, outros isolados importantes de porcos foram *S. derby* (17,1%), *S. infantis* (8,0%), *S. panama* (5,1%), *S. ohio* (4,9%),
 5 *S. london* (4,4%), *S. livingstone* (3,1%), *S. virchow* (2,7%), *S. bredeny* (2,1%), *S. mbandaka* (1,1%), *S. Brandenburg* (1,0%), *S. goldcoast* (0,8%).

No caso de galinhas, 14% das galinhas foram *Salmonella*-positivas em nível de bando em 2002 nos Países-Baixos. O sorovar predominante foi naquele caso de *S. paratyphi B var. Java*. Em nível de venda
 10 a varejo uma percentagem comparável (13,4%) foi encontrada nos Países-Baixos. Os sorovares de *Salmonella* mais freqüentes isolados de frangos 14 estados membros da Comunidade Européia foram *S. paratyphi B var. Java* (24,7%), *S. enteritidis* (13,6%), *S. infantis* (8,0%), *S. virchow* (6,7%), *S. livingstone* (5,7%), *S. mbandaka* (5,5%), *S. typhimurium* (5,3%), *S.*
 15 *senftenberg* (5,0%), *S. hadar* (3,7%). *S. paratyphi B var. Java* é dominante, mas isto é totalmente atribuível aos Países-Baixos.

Tabela 1. Alguns sorovares de *Salmonella* considerados como agentes zoonóticos importantes em frangos e porcos listados com seus perfis de antígeno O (Popoff, 2001)

Sorovar de <i>Salmonella</i>	Galinha (C) / porcos (P)	Perfil de antígeno O	sorogrupo
<i>Brandenburg</i>	P	4, [5], 12	B
<i>Bredeny</i>	P	<u>1</u> , 4, 12, <u>27</u>	B
<i>Derby</i>	P	<u>1</u> ^a , 4, [5] ^b , 12	B
<i>Enteritidis</i>	C	<u>1</u> , 9, 12	D ₁
<i>Goldcoast</i>	C/P	6, 8	C ₂
<i>Infantis</i>	C/P	6, 7, <u>14</u>	C ₁
<i>Livingstone</i>	P	6, 7, <u>14</u>	C ₁
<i>London</i>	P	3, 10, [15]	E ₁
<i>Mbandaka</i>	P	6, 7, 14	C ₁
<i>Meleagridis</i>	P	3, 10, [<u>15</u>], [<u>15</u> , 34] ^c	E ₁
<i>Ohio</i>	P	6, 7, 14	C ₁
<i>Panama</i>	P	<u>1</u> , 9, 12	D ₁
<i>Paratyphi B var. Java</i>	C	<u>1</u> , 4, [5], 12	B
<i>Typhimurium</i>	C/P	<u>1</u> , 4, [5], 12	B
<i>Virchow</i>	P	6, 7, 14	C ₁

^a Antígeno O determinado por conversão em fago é indicado por sublinhado.

^b Antígenos O que podem estar presentes ou ausentes são indicados entre colchetes.

^c Lisogenizado por fago ϵ_{15} [15] e por fago ϵ_{34} [15, 34]

5 Em uma primeira modalidade, a invenção proporciona um método para imobilização de um polissacarídeo sobre um suporte, compreendendo contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e um polímero compreendendo pelo menos dois grupos amina e/ou amida para obter um complexo de polissacarídeo-polímero e copular o citado complexo

10 de polissacarídeo-polímero em citado suporte. O polímero pode ser qualquer polímero que contém pelo menos dois grupos amina e/ou amida. Os citados pelo menos dois grupos amina e/ou amida preferivelmente ligam cruzadamente o citado polímero no citado polissacarídeo e no citado suporte. Para permitir copulação mais eficiente é preferido que o citado polímero

15 compreenda pelo menos 4 e mais preferivelmente pelo menos 7 grupos amina ou amida. O polímero compreende pelo menos 10 blocos de construção. Blocos de construção de um polímero compartilham grupos reativos característicos que permitem alongamento do polímero. Um bloco de construção preferido é um aminoácido ou uma parte funcional, um derivado

20 e/ou um análogo do mesmo. Em uma modalidade preferida o citado polímero compreende uma proteína. Uma proteína compreende pelo menos uma cadeia de polipeptídeo compreendendo pelo menos 10 aminoácidos ou equivalentes funcionais do mesmo. Uma proteína contém pelo menos constituintes possuindo grupos amina e/ou amida livres. No contexto da invenção a

25 proteína também pode ser um multímero compreendendo pelo menos duas cadeias de polipeptídeo que estão não-covalentemente ou covalentemente ligadas umas nas outras. A proteína pode compreender modificações tais como aquelas comuns para sistemas biológicos tal como glicosilação após tradução. A proteína também pode ser artificialmente modificada ou

proporcionada com um outro grupo desde que ela possua disponíveis os mencionados grupos amina e/ou amida.

Em uma modalidade preferida o citado polissacarídeo é derivado de uma bactéria gram-negativa. A sensibilidade de um tal suporte preparado é muito melhorada quando o polissacarídeo (antígeno O) antes da
5 imobilização sobre o suporte é oxidado na presença de um polímero compreendendo pelo menos dois grupos amina e/ou amida, preferivelmente uma proteína. Embora não desejemos nos basearmos em qualquer teoria, é correntemente considerado que os grupos aldeído que resultam da oxidação
10 dos polissacarídeos são capazes de reagir com os grupos amino da proteína para formar uma imina substituída (ligação de base de Schiff). Após uma injeção sobre o suporte (um ativado) (por exemplo um *chip sensor*) os grupos aldeído disponíveis reagem com hidrazida para formarem hidrazona. A redução seguinte estabiliza não apenas a ligação covalente entre o suporte
15 (por exemplo um suporte compreendendo dextrano) e o polissacarídeo mas também a ligação imina entre a proteína e o polissacarídeo. Como será explicado com mais detalhe na parte experimental, polissacarídeos (antígenos O) de sorotipos diferentes de *Salmonella* têm sido imobilizados sobre um suporte. Os suportes preferidos foram subseqüentemente submetidos a uma
20 análise-SPR com soros padrão. A resposta sorológica obtida foi usada como um indicador para o sucesso do método. Quando reações de copulação foram realizadas sem a etapa de oxidação nenhuma resposta ou uma resposta quase não significativa de soros de referência pôde ser detectada.

Preferivelmente, a imobilização / copulação do complexo de
25 polissacarídeo-proteína em um suporte é tal que robustez e/ou sensibilidade altas são obtidas. Visto que antígenos flagelares se desnaturam e perdem sua antigenicidade com respeito aos anticorpos de soro embora o *chip sensor* tenha que ser regenerado para um ciclo de análise seguinte com solventes relativamente agressivos, os antígenos somáticos são encontrados bastante

estáveis com respeito a estes solventes de regeneração. De fato, é crido que a perda de atividade de antígeno O imobilizado está primariamente associada com a degradação da superfície sólida, a saber perda gradual de camada de dextrano ligada em filme de ouro, na qual os antígenos estão ligados. O método de acordo com a invenção resulta em um suporte que é mais robusto comparado com um suporte da arte anterior.

Preferivelmente, a invenção proporciona um método para imobilização de um polissacarídeo sobre um suporte, compreendendo contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e uma proteína para obter um complexo de polissacarídeo-proteína e copular o citado complexo de polissacarídeo-proteína em citado suporte, no qual o citado polissacarídeo é derivado de uma bactéria gram-negativa e ainda mais preferivelmente no qual o citado polissacarídeo é derivado de uma *Enterobacteriaceae*. Ainda bem mais preferivelmente, o citado polissacarídeo é derivado de uma bactéria gram-negativa que é um patógeno de planta, veterinário ou de humano. Exemplos de tais polissacarídeos são polissacarídeos derivados de uma (sub)espécie de *Salmonella*. Outros exemplos são polissacarídeos derivados de espécie de *Escherichia coli* (por exemplo *E. coli* O157) e de espécies bacterianas descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Exemplos de bactérias contendo LPS patogênicas para humano e/ou animais.

Espécies Bacterianas	Principalmente encontradas em	Afetando
<i>Campylobacter coli</i>	Suíno	Humanos
<i>Campylobacter jejuni</i>	Espécies de ave, cães	Humanos
<i>Campylobacter lari</i>	Gaivota	Humanos
<i>Escherichia coli</i> O157	Ruminantes	Humanos
<i>Legionella pneumophila</i>	Água	Humanos
<i>Listeria monocytogenes</i>	Como contaminante de processamento de alimento	Humanos
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Suíno	Suíno
<i>Salmonella enteritidis</i>	Espécies de ave, suíno	Humanos
<i>Salmonella gallinarum</i>	Espécies de ave	Chickens
<i>Salmonella goldcoast</i>	Suíno	Humanos
<i>Salmonella infantis</i>	Galinhas	Humanos
<i>Salmonella livingstone</i>	Suíno	Humanos
<i>Salmonella meleagridis</i>	Suíno	Humanos
<i>Salmonella pollorum</i>	Espécies de ave	Galinhas

<i>Salmonella typhimurium</i>	De ave	Humanos, cavalos
<i>Streptococcus suis</i>	Suíno	Suíno, humanos
<i>Vibrio cholerae</i> (não-O1)	Animais aquáticos	Humanos
<i>Vibrio paraheamolyticus</i>	Animais aquáticos	Humanos
<i>Vibrio vulnificus</i>	Animais aquáticos	Humanos
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Suíno	Humanos

Como será explicado com mais detalhe adiante, um suporte compreendendo um polissacarídeo (antígeno O) imobilizado é particularmente útil na diagnose de bactérias contendo LPS mencionadas.

O termo "polissacarídeo" é intencionado para significar uma entidade compreendendo duas ou mais unidades de monossacarídeo ligadas por glicosídeo e inclui, dentre outros, um oligossacarídeo (2-10 resíduos) bem como um polissacarídeo (mais do que 10 monossacarídeos). A ligação pode resultar em polissacarídeo linear ou ramificado. Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para imobilização de um polissacarídeo sobre um suporte, compreendendo contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e uma proteína para obter um complexo de polissacarídeo-proteína e copular o citado complexo de complexo de polissacarídeo-proteína, no qual o citado polissacarídeo é um lipopolissacarídeo (LPS), i.e. um polissacarídeo compreendendo lipídeo A. Está claro para uma pessoa experiente na arte que o (lipo)polissacarídeo usado tem que compreender uma estrutura antigênica e um grupo disponível / adequado para proporcionar uma ligação entre a proteína e o polissacarídeo. Mais detalhes com respeito ao último ítem serão proporcionados adiante. Como consequência, desde que o (lipo)polissacarídeo compreenda uma estrutura antigênica e um grupo adequado para proporcionar uma ligação entre a proteína e o polissacarídeo um método de imobilização da invenção pode ser usado para obter um suporte sensível e/ou robusto. O LPS é expressado no exterior celular e é parte da parede celular bacteriana. A expressão de LPS não está sob o controle genético direto, de modo que LPS é uma reunião de moléculas diferentes com composição de lipídeo A variada em termos da cadeia alifática ligada. Além disso, a célula bacteriana pode

sintetizar LPS rugoso com ou sem uma cadeia de carboidrato curta existindo maior do que 50 unidades repetidas expressando sua antigenicidade. Em adição a esta heterogenicidade, dentro de uma única molécula de LPS, várias entidades de antígeno O, que são distintamente numeradas, podem ser expressadas. Um perfil de antígeno O é, contudo, por definição único para um sorogrupo de *Salmonella*. Uma sorotipificação de uma *Salmonella* também inclui antígenos H bem como antígenos Vi.

LPS pode ser obtido por uma variedade de métodos e a parte experimental descreve com mais detalhe o uso de uma extração em ácido triclorico (opcionalmente seguida por extração em etanol e diálise) de acordo com Staub (1965) para este propósito. Outros exemplos de métodos de extração adequados são descritos por Wilkons (1996) e incluem, mas não são restritos a, extrações com dietileno-glicol, dimetil-sulfóxido, NaCl-dietil-éter (1:2 (v/v)), NaCl-butan-1-ol (1:1 (v/v)), EDTA aquoso, NaCl-citrato de sódio, fenol aquoso ou fenol aquoso - clorofórmio petróleo.

A pureza da batelada de LPS usado / obtido não é considerada extremamente crítica. É experimentado que o LPS não tem que estar completamente livre de contaminantes. A reação de copulação específica proporciona um certo grau de seletividade. Além disso, como descrito na parte experimental, o LPS usado / obtido (preferivelmente uma batelada de LPS) é otimizado com respeito à quantidade de proteína necessária para uma resposta ótima. Está claro para uma pessoa experiente na arte que o LPS preferivelmente compreende não muito LPS rugoso. A batelada de LPS preferida essencialmente compreende LPS liso.

Embora não desejemos nos basear em qualquer teoria é correntemente considerado que a presença de um ácido 2-ceto-3-desóxi-octônico (KDO) e/ou de uma glicerol-manoheptose (Hep) e/ou de um GlcNAc no núcleo da molécula de LPS é necessária para uma copulação covalente.

Embora muitas bactérias diferentes estejam incluídas no termo bactérias gram-negativas é crido que os LPS de todas estas bactérias são adequados para uso na invenção presentemente reivindicada desde que o LPS compreenda pelo menos um constituinte com grupos hidroxila vicinais não-conjugados ou desconjugados, preferivelmente na região de núcleo da molécula de LPS. Em *Salmonella*, os constituintes mais provavelmente candidatos são resíduos de KDO e Hep e GlcNAc. A presença ou ausência de um tal grupo KDO e/ou Hep e/ou GlcNAc é indiretamente geneticamente determinada. Embora a informação genética necessária para construir o sorotipo de espécie ou até mesmo de monossacarídeos específicos de cepa esteja presente no organismo correspondente, ela depende das circunstâncias de crescimento se o citado LPS contém monossacarídeos aldeído-conversíveis na região de núcleo.

Claro que também há outras fontes de LPS disponíveis, tal como sua compra comercial.

Em uma modalidade preferida, a invenção proporciona um método para imobilização de um polissacarídeo sobre um suporte, compreendendo contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e uma proteína para obter um complexo de polissacarídeo-proteína e copular o citado complexo de polissacarídeo-proteína no citado suporte, no qual a citada proteína é uma proteína (por exemplo uma proteína de soro) com uma certa quantidade de aminas (primárias). Preferivelmente, pelo menos algumas destas aminas não estão estericamente impedidas e/ou não participam de ligações não-covalentes, tais como pontes de H-H ou interações de dipolo-dipolo e/ou não estão protonadas. Uma tal proteína preferivelmente não possui um quase não possui, quaisquer propriedades imunogênicas e como consequência anticorpos de reação cruzada direcionados para a proteína usada são evitados tanto quanto possível. Exemplos de tais proteínas são hemoglobina (Hb), ovalbumina (Ob), mioglobina(Mb) e albumina de soro

(SA). Foram determinadas as respostas de biossensor de soros padrão diferentes sobre LPS imobilizado oxidado na presença de Hb ou Ob ou Mb ou SA. Albumina de soro, mioglobina e hemoglobina deram, os resultados mais promissores. Em uma modalidade preferida a proteína é hemoglobina ou mioglobina.

A proteína necessária é obtida comercialmente ou por (sobreexpressão) em um sistema de expressão adequado ou por seu isolamento de uma fonte adequada. Hemoglobina tem sido por exemplo obtida por seu isolamento do sangue. Preferivelmente as bateladas de proteína usadas são tão puras quanto possível, eliminando-se deste modo o máximo de reações cruzadas quanto possível. Contudo é experimentado que quantidades pequenas de contaminação são permitidas sem porem e perigo a sensibilidade e/ou a robustez dos suportes obtidos.

A razão de (lipo)polissacarídeo para proteína depende, dentre outras coisas, da proteína usada. Experimentos com Hb têm mostrado que concentrações entre 15% e 50% (m/m) têm resultado em resultados satisfatórios. Quando albumina de soro bovino é usada razões muito menores, entre 0,7% e 7% (m/m), são usadas. Alguns exemplos: a concentração de Hb ótima para LPS de *S. livingstone* é de cerca de 50% (m/m) e para LPS de *S. enteritidis* a concentração de Hb ótima é de 15% (m/m).

As preparações de LPS isoladas são preferivelmente oxidadas na presença de uma proteína facilitada por um agente oxidante. Em uma modalidade preferida a invenção proporciona um método para imobilização de um polissacarídeo sobre um suporte, compreendendo contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e uma proteína para obter um complexo de polissacarídeo-proteína e copular o citado complexo de polissacarídeo-proteína no citado suporte, no qual o citado agente oxidante é capaz de oxidar dióis vicinais. Ainda mais preferivelmente, o agente oxidante preferivelmente oxida dióis vicinais pelo menos sob condições controladas.

Oxidação de dióis vicinais é preferida por que isto garante copulação confiável de um polissacarídeo contendo diol vicinal na matriz. Em uma modalidade preferida da invenção os polissacarídeos a serem copulados na matriz contêm um antígeno que é para ser reconhecido por um membro de um

5 par de ligação. Para ser reconhecível é preferido que o antígeno seja deixado não modificado pelo menos na maioria dos polissacarídeos que estão sendo copulados no suporte. Isto requer um balanço entre o nível de oxidação requerido para obter copulação eficiente na matriz e a disponibilidade de antígeno para associação com o membro do par de ligação. O último requer

10 que o antígeno seja deixado essencialmente não afetado pela oxidação pelo menos em uma quantidade suficiente a ser usável em um ambiente diagnóstico. Oxidação de dióis vicinais de acordo com a presente invenção garante a disponibilidade de antígeno suficiente em forma reconhecível enquanto que ao mesmo tempo permite copulação eficiente do polissacarídeo

15 no suporte. Em uma modalidade preferida o citado agente oxidante compreende m-periodato (de sódio). Outros periodatos tal como periodato de potássio ou outros sais do mesmo também são adequados para permitir oxidação preferencial de dióis vicinais de acordo com a presente invenção. Oxidação de dióis predominantemente vicinais em um polissacarídeo da

20 invenção pode ser tipicamente realizada pela incubação de citado polissacarídeo com o citado periodato em uma concentração entre 1 mM e 10 mM de periodato. Outros parâmetros da reação influenciam tanto a velocidade quanto o tipo de reação predominantemente realizada. Um exemplo é tempo de incubação. Quando se aplicam tempos de incubação

25 muito curtos periodato acima de 10 mM pode ser usado. Periodato preferivelmente oxida dióis vicinais, particularmente os dióis vicinais mais suscetíveis nas cadeias laterais do polissacarídeo. Assim desde que sejam escolhidas as denominadas condições de reação 'brandas', serão oxidados preferivelmente dióis vicinais. Quando são escolhidas condições que também

permitem mais freqüentemente ocorrência de outras reações de oxidação (por exemplo por causa da depleção do substrato diol vicinal), o antígeno presente no polissacarídeo será significativamente afetado. Assim para a presente invenção uma oxidação por periodato é citada como sendo branda quando as

5 concentrações preferidas mencionadas são usadas e quando pelo menos 20% e preferivelmente pelo menos 50%, com maior preferência pelo menos 70% e mais preferivelmente cerca de 90% do antígeno permanece intacto após a oxidação. Disponibilidade ou integridade do antígeno é preferivelmente medida por meio de um ensaio ELISA usando um anticorpo padronizado. De

10 novo nós não desejamos nos basear em qualquer teoria mas é correntemente considerado que periodato induzirá uma ruptura oxidativa de ligações entre dióis vicinais sobre grupos especialmente carboidrato, como em e.g. manose, para dar funcionalidades aldeído. Esta reação é tipicamente realizada em tampões em uma faixa de pH entre 4,5 e 5,5 no escuro usando um meta-

15 periodato de sódio 1-100 mM (preferivelmente) recém-preparado em acetato de sódio 0,1 M. Preferivelmente a reação é realizada em uma concentração entre 1 mM e 10 mM de meta-periodato. A oxidação é realizada na presença de uma proteína dentro das faixas como discutido acima. Os compostos bis-

20 aldeído, como os constituintes de monossacarídeo oxidados na cadeia de polissacarídeo de LPS, podem reagir com qualquer grupo amino em uma proteína e podem formar uma ligação de base de Schiff resultando em uma imina substituída. Quando um ou ambos os grupos hidroxila vicinais são condensados em uma ligação açúcar covalente, a função hidroxila é perdida e não ocorre oxidação. Este é o caso de muitos polissacarídeos ramificados e/ou

25 linearmente ligados. No caso de LPS de *Salmonella*, a estrutura de núcleo interna transporta na maioria dos casos um Gal, GlcNAc, Hep e/ou KDO oxidável, mas constituintes Hep e KDO não-redutores são mais suscetíveis à oxidação, em particular em condições de oxidação muito brandas em concentrações de meta-periodato menores do que 6 mM. Devido ao fato de a

região de núcleo ser uma parte bastante conservada de LPS de *Enterobacteriaceae* diferentes, (lipo)polissacarídeos de membros de *Enterobacteriaceae* podem ser aplicados em um método da invenção.

Periodato também oxidará, quando presente, certos derivados de amino-etanol tais como os resíduos de hidróxi-lisina em colágeno, bem como metionina (para seu sulfóxido) e certos tióis (normalmente para dissulfetos). Em adição, resíduos de serina e de treonina N-terminais de peptídeos e de proteínas podem ser seletivamente oxidados por periodato em grupos aldeído. Estas reações, contudo, normalmente ocorrem em uma velocidade menor do que a da oxidação de dióis vicinais e a presença de tal grupo não interfere substancialmente com um método de acordo com a invenção. A invenção também proporciona um método para imobilização de um polissacarídeo sobre um suporte, compreendendo contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e uma proteína para obter um complexo de polissacarídeo-proteína e copular o citado complexo de polissacarídeo-proteína no citado suporte, adicionalmente compreendendo uma etapa que resulta no término / na interrupção do processo de oxidação, por exemplo por dessalinização de citado complexo de polissacarídeo-proteína. Isto é por exemplo realizado com o auxílio de uma coluna de NAP-5. Contudo, a pessoa experiente na arte está ciente de que há muitos outros métodos que possuem o mesmo efeito, por exemplo adição de um redutor ou de uma molécula facilmente oxidável tal como glicerol. Preferivelmente, o modo de interromper a oxidação é aquele no momento que é realizada mudança de tampão, por exemplo HPLC, FPLC, diálise, trocadores de íons, eletroforese em gel ou ultrafiltração. Para propósitos de armazenagem, a produção de alíquotas evaporadas, após adição de proteína, também é descrita dentro da parte experimental. Isto resulta na presença de um estoque grande de material reproduzível.

A invenção portanto adicionalmente compreende o

intermediário obtido, i.e. a preparação de na presença de polissacarídeo oxidado proteína, opcionalmente dessalinizada e opcionalmente evaporada.

Preferivelmente, o suporte usado é feito de um material não-hidrofóbico, inerte, e a ligação do complexo de LPS-proteína no citado
5 suporte é covalente. Ainda mais preferivelmente um tal suporte possui uma ligação de proteína baixa ou ligação biomolecular baixa. Exemplos são um suporte de vidro ou sílica ou de um plástico não-hidrofóbico. Em uma modalidade preferida o citado suporte está na forma de uma microesfera ou glóbulo. Vários tipos de microesferas ou glóbulos estão disponíveis para a
10 pessoa experiente na arte. Em uma modalidade preferida a citada microesfera ou glóbulo compreende poliestireno. Microesferas ou glóbulos são particularmente preferidos porque podem ser proporcionados com antígenos diferentes usando um método da invenção. Microesferas ou glóbulos com antígenos diferentes podem ser consequentemente codificados com uma cor
15 diferente. Teste de uma amostra para a presença de um anticorpo contra um antígeno pode ser feito usando uma coleção de microesfera ou glóbulos mencionados. Ligação do anticorpo em um tipo particular de antígeno pode ser agora detectada facilmente pelo código de cor da microesfera ou glóbulo ligado. Ligação do anticorpo pode ser detectada em várias maneiras. Por
20 exemplo, microesfera ou glóbulos contendo anticorpo ligado pode ser extraída(o) da amostra e medida(o) usando um outro anticorpo específico para a região constante de anticorpo. Por outro lado, amostra pode ser diretamente analisada, i.e. na ausência de outras manipulações por marcação do anticorpo ligado e simultaneamente detecção da cor do anticorpo e da cor da
25 microesfera ou glóbulo. Vários métodos para detecção simultânea de duas ou mais cores estão disponíveis para a pessoa experiente na arte. Na presente invenção, uma cor é definida como qualquer tipo de radiação eletromagnética que pode ser detectada, ser uma cor típica revelada, por exemplo, por reflexão de luz, para luz emitida como um resultado de fluorescência ou

fosforescência.

A invenção assim adicionalmente proporciona uma coleção de pelo menos duas microesferas ou glóbulos na qual pelo menos as duas citadas pelo menos duas microesferas ou glóbulos compreendem cada um antígeno diferente da presente invenção. Em uma modalidade preferida o citado antígeno compreende antígeno O de *Salmonella*. Em uma modalidade particularmente preferida o citado antígeno é ligado em citado suporte de microesfera ou glóbulos usando um método da invenção. Assim preferivelmente pelo menos um de citados microesfera ou glóbulos compreende um revestimento de polissacarídeo ligado em um polissacarídeo compreendendo um antígeno a ser detectado ligado um no outro via um polímero compreendendo pelo menos dois grupos amina e/ou amida, preferivelmente uma proteína da invenção, no qual o citado polímero de ligação (proteína) é ligado no citado polissacarídeo compreendendo o citado antígeno, via um grupo amina e/ou amida sobre o citado polímero e um diol vicinal oxidado por periodato sobre o citado polissacarídeo compreendendo citado antígeno.

Em uma modalidade preferida a invenção proporciona um método para imobilização de um polissacarídeo sobre um suporte, compreendendo contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e uma proteína para obter um complexo de polissacarídeo-proteína e copular o citado complexo de polissacarídeo-proteína no citado suporte, adicionalmente compreendendo ativar a superfície de citado suporte. Em uma modalidade ainda mais preferida, o citado suporte compreende uma superfície de vidro revestida com ouro e ainda mais preferido o citado suporte é modificado com um doador de carboxila. Uma superfície pode ser ativada. Grupos ácido carboxílico (COOH) (adicionalmente referidos como grupos carboxila) são necessários sobre esta superfície. Preferivelmente estes grupos COOH são proporcionados por uma camada homogênea estável de moléculas, que podem

ter sido modificadas para este propósito. Estas superfícies podem existir de, mas não limitadas a, polissacarídeos, alcanos ou alquenos modificados com ácido carboxílico, tal como um polietileno, ligado em por exemplo, superfícies de ouro, poliestireno ou silício. Preferivelmente o suporte
5 compreende um polissacarídeo que atua como um doador de carboxila. Mais preferivelmente uma camada de dextrano carboximetilado na qual o citado suporte modificado por polissacarídeo, preferivelmente compreendendo uma camada de dextrano é ativado com cloridrato de 1-etil-3-(3- dimetil-amino-propil)-carbodiimida e N-hidróxi-succinimida. A ativação é preferivelmente
10 seguida pela preparação com carbohidrazina. Na etapa seguinte o complexo de polissacarídeo-proteína é adicionado na camada de dextrano ativada. As funcionalidades aldeído reativas reagem espontaneamente com a hidrazida a hidrazonas, que são então reduzidas para estabilizar as ligações covalentes. Antes do uso rotineiro, o desempenho de LPS chip-conjugado para ligar
15 anticorpos anti-*Enterobacterium* (por exemplo *Salmonella*) é avaliado usando soros de aglutinação policlonal de referência.

Dependendo da questão analítica / diagnóstica indagada é decidido se um ou por exemplo pelo menos dois carboidratos representando sorogrupo diferentes, preferivelmente 4 carboidratos representando sorogrupo
20 diferentes são usados. No caso de se ter interesse em saber qual sorogrupo particular está presente, múltiplos carboidratos representando sorogrupo diferentes (cuja quantidade é diferente sobre a questão particular inquirida e sobre a aparelhagem usada) são utilizados e se apenas se deseja saber se por exemplo um animal está ou tem sido infectado por um sorogrupo particular,
25 um único carboidrato representando sorogrupo pode ser oxidado na presença de uma proteína e imobilizado sobre o um suporte. O uso de pelo menos dois carboidratos representando sorogrupo diferentes resulta em um suporte que pode ser usado em uma análise de multi-sorogrupo. Mais preferivelmente pelo menos três e até mesmo mais preferido pelo menos mais do que três (por

exemplo quatro) polissacarídeos diferentes são usados. Estes polissacarídeos podem ser oxidados na presença de um tipo de proteína ou na presença de tipos diferentes de proteína. A pessoa experiente é capaz de fazer qualquer combinação sensível. Por exemplo, para se ser capaz de detectar mais do que

5 90% de todas as infecções de *Salmonella* sorogrupos B, C e D em galinha sorogrupos B, C, D e E em porcos devem ser representados.

Uso de um tipo de carboidratos representando sorogrupo é extremamente útil se se está interessado na questão de se ou não um certo tipo de bactéria está ou esteve presente. Uso de múltiplos carboidratos

10 representando sorogrupo diferentes é por exemplo útil se se deseja determinar se um animal está ou esteve infectado por qualquer bactéria gram-negativa (por exemplo *Enterobacteriaceae*).

Em uma modalidade preferida a invenção proporciona um método para imobilização de um polissacarídeo sobre um suporte,

15 compreendendo contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e uma proteína para obter um complexo de polissacarídeo-proteína e copular o citado complexo de polissacarídeo-proteína no citado suporte, no qual o citado suporte é um chip biossensor. Um tal chip biossensor está comercialmente disponível (por exemplo aquele produzido por Biacore) e

20 como consequência não será proporcionada formação adicional.

Em outra modalidade a invenção proporciona um suporte obtido pelo método de acordo como descrito acima ou um suporte compreendendo um complexo de polissacarídeo-proteína imobilizado sobre sua superfície. Em uma modalidade da invenção um suporte da invenção

25 compreende um revestimento de polissacarídeo que é ligado em um outro revestimento de polissacarídeo via aminação redutiva, no qual o citado outro revestimento de polissacarídeo compreende uma proteína copulada em citado outro revestimento de polissacarídeo por meio de oxidação de dióis vicinais sobre o citado outro polissacarídeo - proteína. Em uma modalidade preferida a

citada aminação redutiva é realizada. Em uma modalidade preferida a invenção proporciona um suporte compreendendo um revestimento de polissacarídeo que é copulado no polissacarídeo.

Em ainda outra modalidade a invenção proporciona biossensor compreendendo um suporte de acordo com a invenção. Se o suporte é obtido por um método de acordo com a invenção pode ser por exemplo determinado pela extração dos polissacarídeos de citado suporte e determinação de se proteína covalentemente ligada está presente. Como já discutido acima o suporte também pode compreender polissacarídeos diferentes imobilizados (por exemplo antígenos O) possivelmente em combinações com tipos diferentes de proteína. Contudo, também um tipo de proteína pode ser usado na oxidação de polissacarídeos diferentes.

Se um suporte e/ou chip da invenção é empregado pode ser por exemplo determinado com o auxílio de MALDI-MS possivelmente em combinação com digestão proteolítica. Uma tal análise proporciona informação com respeito à proteína e ao polissacarídeo usados. Com o auxílio de hidrólise ácida os complexos de polissacarídeo-proteína são liberados do suporte. Uma tal mistura obtida é então submetida à análise LC-MS/MS antes e após hidrólise proteolítica. O complexo obtido também pode ser submetido a uma análise de monossacarídeo, por exemplo GC-MS após metanólise e/ou degradação de Smith, da qual é determinado qual tipo de LPS é usado. Esta informação é adicionalmente usada para determinar se KDO, Hep ou outros açúcares têm sido oxidados.

Um suporte da invenção pode ser usado em diferentes sistemas de detecção, por exemplo óptico, térmico, acústico, amperométrico, magnético ou químico e um suporte da invenção pode ser usado em qualquer ensaio de interação biomolecular (BIA) ou qualquer ensaio de afinidade (AA). Como um exemplo não-limitante, o uso de detecção óptica via Ressonância de Plasmon de Superfície é descrito com mais detalhe.

A invenção proporciona um sistema de detecção por Ressonância de Plasmon de Superfície compreendendo um biossensor como descrito acima. A camada de ouro no chip sensor cria as condições físicas requeridas para Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR). O princípio de SPR será descrito no contexto dos instrumentos Biacore. Eles incorporam o fenômeno de SPR para monitorar interações biomoleculares em 'tempo real'. Em uma interface entre dois meios transparentes de índice de refração diferente tais como vidro e água, luz proveniente do lado de índice de refração mais alto é parcialmente refletida e parcialmente refratada. Acima de um certo ângulo crítico de incidência nenhuma luz é refratada através da interface e reflexão interna total (TIR) ocorre na interface de filme metálico - líquido. Esta é onde luz atravessa através de um meio opticamente denso tal como vidro, e é refletido de volta através daquele meio na interface com um meio opticamente menos denso tal como tampão.

Embora a luz incidente seja totalmente refletida, o componente de campo eletromagnético, chamado de onda evanescente, penetra uma distância da ordem de um comprimento de onda no meio menos opticamente denso. A onda evanescente é gerada na interface entre um prisma de vidro (índice de refração alto) e uma camada de tampão (índice de refração mais baixo). Se a interface entre os meios de índices de refração mais alto e mais baixo estiver revestida com um filme metálico fino (uma fração de comprimento de onda de luz), então a propagação da onda evanescente interagirá com os elétrons sobre a camada de metal. Metais contêm nuvens de elétrons em sua superfície, que podem copular com a luz incidente em certos ângulos. Estas nuvens de elétrons são também conhecidas como plasmons, e a passagem da onda evanescente através da camada de metal faz com que os plasmons ressonem, formando uma onda mecânica de um quantum conhecida como um plasmon de superfície. Portanto, quando ocorre ressonância de plasmon de superfície, energia da luz incidente é perdida para o filme de

metal resultando em um decréscimo na intensidade de luz refletida. O fenômeno de ressonância apenas ocorre em um ângulo agudamente definido da luz incidente. Este ângulo é dependente do índice de refração do meio próximo da superfície de filme metálico. Mudanças no índice de refração da solução tampão (e.g. um aumento na concentração de solutos), para uma distância de cerca de 300 nm da superfície de filme metálico portanto alteram o ângulo de ressonância. Monitoração contínua deste ângulo de ressonância permite a quantificação de mudanças em índice de refração da solução tampão próximo da superfície de filme metálico. Em Biacore de ‘tempo real’, as propriedades do filme metálico, o comprimento de onda, e o índice de refração do vidro (meio mais denso) são todos mantidos constantes, e como um resultado a SPR pode ser usada para monitorar o índice de refração da camada aquosa imediatamente adjacente à camadas de metal (ouro). No sistema Biacore o chip é composto de vidro, possui 4 canais e a camada de ouro associada está coberta com uma camada de dextrano quimicamente modificado para facilitar imobilização de ligantes tais como anticorpos ou antígenos. Quaisquer mudanças em massa que ocorrem devido à ligação do analito com o anticorpo imobilizado sobre o chip sensor causarão uma mudança no ângulo de SPR, que é monitorada em ‘tempo real’ e quantificada como um sensorgrama. Uma mudança de massa de aproximadamente 1 kRU (1.000 RU) corresponde a uma mudança de massa em concentração de proteína de superfície de 1 ng/mm². Respostas típicas para ligação de superfície de proteínas são da ordem de 0,1-20 kRU.

Não há necessidade de moléculas marcadoras com etiquetas fluorescentes ou radioativas de modo se evitar a possibilidade de que os marcadores possam comprometer a atividade e ainda mais dificultar ou encarecer a química necessária para marcação.

Os suportes obtidos podem ser usados em tipos diferentes de análises, tais como bacteriologia (ensaio direto) ou sorologia (ensaio indireto).

Um exemplo de um ensaio sorológico é um método para determinar a presença de um anticorpo direcionado para um antígeno de uma bactéria gram-negativa em uma amostra, compreendendo contatar a citada amostra com um suporte ou um biossensor como descrito acima e determinar se o suporte tem ligado qualquer anticorpo (Figura 1).

Um tal método é por exemplo muito adequado para determinar a presença de um anticorpo direcionado contra um antígeno O e assim é indiretamente estabelecido se uma infecção está presente ou se uma infecção recente tem ocorrido. Um tal método é por exemplo usado para selecionar animais mortos para *Salmonella* ou para selecionar animais para *Salmonella* antes de serem expostos no exterior. Ainda mais, o método também é aplicado às amostras obtidas de animais vivos (por exemplo, de fazenda ou zoológico).

Exemplos de amostras que podem ser usados em um tal método são amostra de tecido, fluido corporal, secreções ou excreções e exemplos mais detalhados são sangue, amostras derivadas de sangue, tecido, suco de carne, leite, ovo, fluidos de um olho, saliva ou fezes. Como já descrito as amostras podem ser obtidas de animais tanto mortos quanto vivos.

Um método de acordo com a invenção não é limitado a um certo (sub)tipo de imunoglobulina mas pode em princípio ser todo (sub)tipo de imunoglobulina tal como (s)IgA₁, (s)IgA₂, IgD, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgY. Além disso, também pode ser qualquer outro material ligante de antígeno. Preferivelmente, um tal material ligante de antígeno é um biomarcador de uma (história) de infecção.

Um tal ensaio sorológico é por exemplo direcionado para um carboidrato representando sorogrupo particular ou para carboidratos representando sorogrupo diferentes (i.e. multi-analito) e como consequência um tal método é por exemplo usado para determinar a presença ou ausência de um certo (sub)tipo de *Salmonella*.

Um exemplo de um ensaio bacteriológico é um método para

determinar a presença de uma bactéria gram-negativa em uma amostra, compreendendo contatar a citada amostra com uma quantidade predeterminada de anticorpos direcionados contra um antígeno de citada bactéria e determinar a quantidade de anticorpos não ligados na citada
5 bactéria com um suporte ou um biossensor como descrito acima.

Preferivelmente o antígeno é um carboidrato representando sorogrupo.

Este método opcionalmente adicionalmente compreende a remoção de anticorpos não ligados da amostra contatada e quantidade
10 predeterminada de anticorpos por exemplo por lavagem ou procedimentos de separação imuno-magnética, centrifugação ou filtração.

Para este tipo de análise cada tipo de amostra pode ser usado, tal como ração animal, esterco, penas, solo, água para consumo ou água de esgoto, carne, suco de laranja, chocolate, pele, hortaliças, etc. Amostras de
15 animal podem ser obtidas de animais tanto vivos quanto mortos. Neste ensaio bacteriológico é usado um tipo único de anticorpo bem como uma mistura de pelo menos dois tipos diferentes de anticorpo (direcionados contra antígenos diferentes, por exemplo dois carboidratos representando sorogrupo diferentes).

20 Preferivelmente, tais ensaios sorológicos e bacteriológicos são realizados de tal modo que ligação em citado suporte ou citado biossensor é determinada por Ressonância de Plasmon de Superfície ou contador de glóbulo ou microesfera fluorescente.

A fonte de amostras é como já descrito acima ilimitada e pode
25 ser por exemplo obtida de um humano ou animal. Exemplos de animais adequados são cavalos (de raça), porcos, aves domésticas (por exemplo galinha, peru, codorniz, pato, e ganso), ruminantes (por exemplo bezerro ou vaca, cabra, ovelha). Os animais podem ser animais de fazenda, animais de zoológico bem como animais vivos livres. Além disso, as amostras destes

animais podem ser obtidas de animais tanto vivos quanto mortos.

Em ainda outra modalidade a invenção proporciona um método para determinar a presença de uma bactéria gram-negativa em uma amostra compreendendo:

- 5 - contatar a citada amostra com bacteriófagos, específicos para bactéria alvo, e permitir que os bacteriófagos infectem a citada amostra,
- remover bacteriófagos não-ligados e/ou não-invasores resultando em uma amostra infectada por bacteriófago,
- contatar a amostra infectada com bacteriófago com um
- 10 organismo indicador suscetível para os bacteriófagos usados,
- incubar durante pelo menos um ciclo de multiplicação de bacteriófago,
- recuperar os bacteriófagos para obter uma amostra contendo bacteriófago,
- 15 - analisar a citada amostra contendo bacteriófago com um suporte ou biossensor de acordo como descrito acima.

Os métodos analíticos em sua maioria requerem antes enriquecimento e crescimento em meios específicos para detectar bactérias, incluindo *Salmonella*. Normalmente preparação de amostra é muito

20 consumidora de tempo relativamente ao tempo de análise total. Geralmente demora 3 a 5 dias antes de a presença de e.g. *Salmonella* poder ser confirmada. Em muitas situações, este tempo para análise é inaceitável e impede comércio e indiretamente ameaça a saúde da comunidade.

O objetivo desta parte da invenção é o desenvolvimento de um

25 método diagnóstico rápido (preferivelmente dentro de 24 h) e/ou custo-efetivo e/ou específico e/ou sensível para a determinação da presença de microorganismos. Por este motivo, é almejado o desenvolvimento de um ensaio de interação biomolecular (BIA) que explora a capacidade de bacteriófagos específicos para gênero e/ou sorovar para se multiplicarem em

suas bactérias ‘vítimas’. Um incremento no número de fago(s) específico(s) para patógeno indica não apenas a presença do organismo alvo mas também é uma medição (semi-)quantitativa para o conteúdo de bactérias alvo na amostra testada.

5 Uma visão geral esquemática do método BIA proposto é mostrada na Figura 2. Uma amostra particulada é homogeneizada por exemplo usando um homogeneizador Stomacher. Amostras líquidas são misturadas por agitação vigorosa. Células analito são então extraídas ou enriquecidas por qualquer método adequado e pode compreender (uma
10 combinação de) crescimento seletivo, centrifugação, filtração e/ou separação imuno-magnética (IMS). Células enriquecidas são fortificadas com bacteriófagos específicos para bactérias e incubadas por uns poucos minutos mantendo agitação. Antes de o ciclo de multiplicação do bacteriófago ser completado, as células são lavadas para remover o mais completamente
15 possível quaisquer bacteriófagos não-ligados e não-invasores. Após o ciclo de multiplicação do bacteriófago, a amostra é contatada com um organismo indicador suscetível, i.e. em uma fase viva que é sensível à penetração e multiplicação intracelular de bacteriófago, ao bacteriófago usado, preferivelmente na concentração mais alta possível (por exemplo cultura
20 noturna concentrada). A suspensão de bacteriófago-bactéria é incubada por pelo menos um ciclo de multiplicação de bacteriófago. A suspensão infectada por fago é então centrifugada ou filtrada para precipitar / remover o material celular e para recuperar bacteriófagos multiplicados. A amostra contendo bacteriófago é injetada sobre um chip biossensor conjugado com LPS (de
25 acordo com a invenção) para reter estas partículas no detector para a geração de resposta de biossensor analito-específico. Para ganhar o máximo de tempo possível o organismo indicador pode ser mantido como uma cultura contínua no laboratório e possuir uma densidade de células normalmente de 10^9 CFU/mL. Uma tal suspensão pode ser concentrada para 10^{10} CFU/mL, porque

densidades celulares mais altas aumentarão a sensibilidade do método proposto.

Este método pode ser usado para determinar um tipo único de sorovar mas para detectar múltiplos sorovares em uma corrida, uma mistura de bacteriófagos diferentes e uma mistura de bactérias indicadoras possivelmente diferentes têm que ser aplicadas. Bacteriófagos específicos para bactérias alvo são descritos na arte anterior e exemplos são proporcionados na parte experimental, por exemplo, bacteriófagos anti-*Salmonella enteritidis*.

Tem sido descrito que fagos se ligam em LPS, incluindo o fago descrito na parte experimental para detecção de *Salmonella*. Chips / suportes adequados são chips / suportes com LPS ou com moléculas de superfície de bactéria imobilizadas (portanto incluindo proteínas de membrana e outras biomoléculas ou uma combinação das mesmas). Uso de LPS de material de membrana celular evitará a geração de anticorpos monoclonais ou policlonais. Se ligação dos fagos nas biomoléculas bacterianas (LPS) não for satisfatória no BIA, anticorpos anti-fago imobilizados em chip biossensor poderão ter que ser usados em um BIA bem sucedido para capturar bacteriófagos da amostra sondada.

A invenção adicionalmente proporciona um kit com componentes adequados para uso em qualquer uma das aplicações descritas. Dependendo da demanda do cliente, um tal kit compreende um chip / suporte pronto para uso obtido por um método de acordo com a invenção. Quando o cliente deseja preparar o suporte por si mesmo, o kit pelo menos compreenderá (lipo)polissacarídeo fortificado / enriquecido com proteína (por exemplo hemoglobina ou albumina de soro) em uma quantidade predeterminada, um quantidade de agente oxidante (por exemplo periodato), tampões adequados. Opcionalmente, um tal kit compreende meio para dessalinização, por exemplo uma coluna de dessalinização. Quando o cliente

deseja misturar (lipo)polissacarídeo e proteína por si mesmo estes componentes serão liberados separadamente juntamente com um manual de instruções. Opcionalmente, um tal kit pode adicionalmente compreender soros de referência positivos e/ou negativos, um tampão de diluição de amostra e algum manual de instruções necessário.

Os métodos como descritos acima são particularmente adequados para seleção de amostras em uma base de escala grande. Em um dos ambientes iniciais (lento) 96 amostras eram checadas dentro de 33 minutos. Em um ambiente de escala grande com equipamento de biossensor relativamente lento 15.000 amostras eram selecionadas dentro de 3 meses. Este número poderia ter sido muito maior mas infelizmente um os abatedouros interrompeu sua participação.

A invenção será explicada com mais detalhe na descrição seguinte, que não é limitante da invenção.

Exemplos

Exemplo 1

Materiais e métodos

1.1 Materiais

1.1.1 Compostos químicos

Kits de copulação de amina, consistindo de N-hidróxi-succinimida (NHS), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)carbodiimida (EDC) e cloridrato de etanol-amina - hidróxido de sódio pH 8,5 e o tampão de corrida (HBS-EP), contendo HEPES 10 mM, cloreto de sódio 150 mM, EDTA 3 mM e 0,005% (v/v) de tensoativo P20 em pH 7,4, foram adquiridos da Biacore AB (Uppsala, Suécia), que também forneceu hidróxido de sódio 50 mM e glicina 10 mM prontos para uso. Etanol, etilenoglicol, cloreto de sódio, hidróxido de sódio e ácido tricloro-acético (TCA) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Sal de sódio de dextrano carboximetilado, cianoboroidreto de sódio e carbohidrazida foram adquiridos

da Fluka Ghemie GmbH (Buchs, Suíça). CHAPS (Plus one) foi fornecido pela Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). Acetato de sódio tri-hidratado e ácido acético foram fornecidos pela J.T. Baker (Deventer, Os Países-Baixos). Cloridrato de guanidina foi obtido de Calbiochem (San Diego, CA, U.S.A.).

5 Mioglobina (Mb) e hemoglobina (Hb) porcina, albumina de galinha (Ob; 98% grau V), albumina de soro bovino (BSA; 96% Fração V), periodato de sódio, Tween-20, Tween-80 e Triton X-100 foram adquiridos de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.). Água foi obtida de um sistema de purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.).

10 1.1.2 Materiais

Colunas NAP-5 (0,5 mL; Sephadex G-25) foram adquiridas de Amersham Biosciences (Roosendaal, Os Países-Baixos) e foram usadas como descrito pelo produtor. Chips biossensores foram adquiridos de Biacore AB. Saco de diálise (Spectra/Por) com um corte de 1 kDa foi obtido de Spectrum

15 Laboratories Inc. (Rancho Dominguez, CA, U.S.A.)

1.1.3 Anti-soros anti-*Salmonella*

Os seguintes anti-soros *lapine* somático 'O' monovalente de *Salmonella* foram usados: anti-O4, anti-O5, anti-O6,7, anti-O8, anti-O9, anti-O10, anti-O12, O Poly E (anti-O3, anti-O10, anti-O15, anti-O19, anti-O34).

20 Em adição, anti-soros *lapine* (Poly A-S) somático 'O' polivalente de *Salmonella* (anti-O2, anti-O3, anti-O4, anti-O5, anti-O6,7, anti-O8, anti-O9, anti-O10, anti-O11, anti-O12, anti-O13, anti-O15, anti-O16, anti-O17, anti-O18, anti-O19, anti-O20, anti-O21, anti-O22, anti-O23, anti-O28, anti-O30, anti-O34, anti-O35, anti-O38, anti-O40, anti-O41) também foram usados. Os

25 soros foram adquiridos de Pro-Lab diagnostics (*Salmonella* Reference Section of the Central Veterinary Laboratory, Weybridge, U.K.). Anticorpos monoclonais de murino específicos para sorogrupo anti-B (anti-O4, O5 em 027), anti-C (anti-O7, 08), anti-D (anti 09, Vi) e anti-E (anti-O3, 019) foram comprados de SIFIN (Berlin, Alemanha).

Soros foram diluídos 1:20 (v/v) em HBS-EP contendo cloreto de sódio 1,0 M, 1% (m/v) de dextrano carboximetilado e 0,05% (v/v) de Tween 80, exceto soro anti-O5 que foi diluído 1:200 (v/v) e as preparações específicas para anti-sorogrupo foram diluídas 1:100 (v/v) no mesmo solvente.

1.1.4 Soros de porcos e de aves de referência

Todos os soros de referência foram obtidos de Dutch Animal Health Service (Deventer, Os Países-Baixos). Os soros de referência de ave foram reativos com *Salmonella enteritidis* (sorogrupo D₁), *S. typhimurium* (sorogrupo B), *S. pullorum* / *gallinarum* (sorogrupo D₁) e *S. infantis* (sorogrupo C₁), e foram adicionalmente referidos como C-Se, C-St, C-Spg e C-Si, respectivamente. Estes soros de galinha foram originalmente preparados para análises ELISA como referências positivas. Em adição, soro de galinha livre de patógeno específico (adicionalmente referido como C-SPF) foi adquirido como uma amostra de referência de controle negativo. Estes soros foram reconstituídos de material seco por congelamento pela adição de água em um volume indicado pelo fabricante. C-Se, C-Spg e C-Si foram diluídos 1:200 (v/v) em HBS-EP contendo cloreto de sódio 1,0 M, 1,0% (m/v) de dextrano carboximetilado e 0,05% (v/v) de Tween-80, enquanto que C-SPF e C-St foram diluídos 1:50 (v/v) na mesma solução. Igualmente, soros porcinos de animais desafiados com *S. typhimurium* e *S. livingstone* (sorogrupo C₁) foram referidos como P-St e P-Sl, respectivamente. Em adição, soro porcino reativo como sorotipo 2 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* usado como controle em um teste de fixação de referência, foi explorado como controle negativo para soro porcino no ensaio de biossensor de *Salmonella*. Os soros porcinos foram diluídos 1:20 (v/v) em HBS-EP contendo cloreto de sódio 1,0 M, 1% (m/v) de dextrano carboximetilado e 0,05% (v/v) de Tween 80 como concentrações finais.

1.1.5 Estoque de *Salmonella*

As bactérias *Salmonella goldcoast* (Sg; sorogrupo C2), *S. livingstone* (Sl) e *S. melaegridis* (Sm; sorogrupo E₁) foram obtidas de uma coleção em casa, enquanto que *S. enteritidis* #23 fago tipo Pt4 (Se), e *S. typhimurium* X- 193 fago tipo 507 (St) foram gentilmente cedidas por F. G. van Zijderveld (Animal Sciences Group, Lelystad, Os Países-Baixos). As bactérias foram crescidas em culturas noturnas em Caldo Nutriente #2 (Oxoid, Basingstroke, U.K.). Estoques de cepas de *Salmonella* foram morfológica e bioquimicamente confirmadas como *Salmonella* e também foram verificadas para a presença dos antígenos O corretos, esperados por uma reação de aglutinação das células com anti-soros anti-antígeno O padrão específicos (Pro-Lab diagnostics) como indicado na Tabela 3 sobre uma placa de vidro. Após diluição de uma metade do volume original com glicerol (Merck), estoques foram armazenados em porções a -80⁰C. **Tabela 3.** Verificação de antígeno O dos sorovares de *Salmonella* usados para produção de LPS. A reação esperada de anti-soros usados para verificação por aglutinação, é dada.

Soro de <i>Salmonella</i>	Soros de aglutinação							
	α -O4 ^a	α -O5	α -O6,7	α -O8	α -O9	α -O10	α -O12	Poly E
<i>S. enteritidis</i> (O9,O12) ^b	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>S. goldcoast</i> (O6,8)	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>S. livingstone</i> (O6,7)	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>S. meleagridis</i> (O3,O10)	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>S. typhimurium</i> (O4,O5,O12)	+	+	-	-	-	-	+	-

^a α -O4: anticorpos reativos com estrutura de antígeno codificada com O4; em um modo similar os anticorpos contra O5, O6,7, O9, O10 e O12 estão indicados.

^b antígenos O específicos para sorovar de *Salmonella* estão indicados entre parênteses

1.2 Métodos

1.2.1 Extração de LPS

Culturas noturnas de *Salmonella* foram preparadas pela aplicação de 100 µL de seus estoques correspondentes sobre cada uma das 120 placas contendo ágar de infusão de coração e cérebro (BHIIa, Oxoid). A presença de sorovar de *Salmonella* esperado foi confirmada por meio de crescimento seletivo convencional, classificação bio- e imunoquímica, sempre que novas suspensões de estoque eram obtidas. As bactérias foram colhidas da superfície das placas para dentro de 1 mL de solução de NaCl 9 g/L (solução salina) por placa de ágar usando uma espátula trigalski. Cada placa foi lavada duas vezes com 2 mL de solução salina. Bactérias foram colhidas em seis tubos de centrifugação. Cada tubo foi complementado com 100 mL de solução salina misturado antes da centrifugação a 10.000 g e a 4°C por 15 min e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa de centrifugação foi repetida duas vezes por suspensão das células em 75 mL de solução salina de lavagem por tubo cada corrida. Enquanto mantidas sobre gelo, as bactérias pelotizadas foram suspensas em água em uma razão volumar, que foi uma de 5 vezes em relação ao peso das bactérias. Um equivolume de TCA 0,250 M (Se) ou 0,500 M (Sg, Sl Sm e St) foi adicionado para dar concentrações finais de 0,12 M e 0,25 M, respectivamente, seguido por agitação contínua a 4°C por 3 h. Um sobrenadante contendo lipopolissacarídeo (LPS) foi então adquirido a 20.000 g e a 4°C por 30 min. O pH do sobrenadante foi ajustado para pH 6,5 com hidróxido de sódio 5 M e quando próximo do pH almejado com hidróxido de sódio 0,10 M. O volume final da solução contendo LPS foi determinado antes da armazenagem a -18°C por 30 min. A solução foi diluída com um volume duplo de etanol absoluto congelado de um local de armazenagem a -18°C, e incubação foi continuada durante a noite a -4°C sem agitação em um dispositivo fechado, construído em casa, com etileno-glicol / água (1:4, v/v) frio circulando. Uma pelota contendo LPS foi obtida após centrifugação a

20.000 g e a -4°C por 30 min. O material particulado foi suspenso em um volume de 0,5 mL de água por grama de massa bacteriana original pesada no início do processo de extração. A suspensão foi dialisada em um saco de diálise de 1-kDa contra água a 4°C por dois dias com reposição de água intermitente regular. O conteúdo do saco foi centrifugado a 20.000 g e a 4°C por 30 min, e o sobrenadante foi liofilizado. O liofilizado foi pesado para estabelecer a recuperação de LPS. LPS foi reconstituído em água para compor uma concentração final de 5 mg/mL. Dependendo do tipo de LPS e da batelada (veja seção 1.2.2), um volume de 1 mg/mL de hemoglobina (Hb) porcina foi adicionado em uma concentração como indicada no texto. Cada batelada foi dividida em porções de frações de LPS de 0,5 mg, que foram secas usando um evaporador a vácuo e então armazenadas a $5-8^{\circ}\text{C}$.

1.2.2 Conteúdo de hemoglobina ótimo

Proteína foi adicionada em uma preparação de LPS antes de sua modificação química e imobilização em um chip sensor para adquirir níveis de revestimento altos e antígenos responsivos a soro altos. O conteúdo ótimo de Hb em cada batelada de LPS foi estabelecido por comparação das respostas de LPS imobilizado que foi fortificado com Hb em níveis diferentes, usando um painel de soros de referência negativos e positivos.

1.2.3 Oxidação de LPS

Uma porção de 0,5 mg de LPS fortificado com hemoglobina foi dissolvida em 500 μL de acetato de sódio 100 mM de pH 5,5. Após a adição de 20 μL de periodato de sódio 50 mM, a solução foi incubada por 40 min sobre gelo protegida da luz. A oxidação de LPS foi interrompida e a solução foi dessalinizada pela passagem de 500 μL da mistura reacional através de um cartucho NAP-5 com um fluxo controlado por gravidade. LPS modificado foi eluído com 1 mL de acetato de sódio 10 mM, pH 4,0. Antes do uso, o cartucho foi condicionado três vezes com 3 mL de acetato de sódio 10 mM, pH 4,0.

1.2.4 Imobilização de LPS

Para imobilizar os antígenos em um chip sensor, os seguintes manuseios foram conduzidos em uma vazão de fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ em um instrumento Biacore 3000 controlado por Biacore 3000 Control Software (version 3.1.1; Biacore). Imobilização de LPS oxidado foi realizada pela execução do procedimento de copulação de aldeído descrito em BIA Applications Handbook, version AB (1998). Resumidamente, a camada de dextrano no chip biossensor CM5 foi ativada com um pulso de 7-min de uma mistura de EDC/NHS disponível do kit de copulação de amina. A ativação também foi imediatamente seguida pela injeção de carbohidrazida aquosa 5 mM por 7 min.

Desativação do excesso de grupos reativos foi então realizada com um pulso de etanol-amina 1 M por 7 min. Antes da imobilização, LPS foi diluído em acetato de sódio de pH 4,0 em uma razão dependente do sorovar de *Salmonella* (veja texto) e imobilizado por 32 min. A ligação entre a matriz de dextrano e o antígeno foi então estabelecida por injeção de cianoboroidreto de sódio 100 mM dissolvido em acetato de sódio 10 mM em pH 4 em uma vazão de fluxo de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ por 20 min. Uma resposta relativa indicativa de um procedimento de imobilização de LPS bem sucedido é 2 kRU para uma solução de LPS de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contendo 15% (m/m) de proteína, e 9 kRU para uma solução de LPS de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contendo 50% (m/m) de proteína.

1.2.5 Ensaio de biossensor SPR

Ensaio de biossensor SPR óptico foram realizados em uma plataforma de biossensor SPR Biacore 3000 controlada pelo mesmo programa de computador como descrito acima. Antes da injeção, soros foram diluídos em tampão HBS-EP contendo 1,0% (m/v) de sal de sódio de dextrano carboximetilado, cloreto de sódio 1,0 M e 0,05% (m/v) de Tween 80 em uma razão de 1:50 (v/v) ou diferentemente como indicado no texto. As misturas foram incubadas por pelo menos 2 min na temperatura ambiente. Soros de

porco fíam incubadas por pelo menos 2 min na temperatura ambiente, enquanto que soros de ave foram injetados por 2 min a 5 µL/min ou 20 µL/min como indicado.

Regeneração do chip para recuperar a atividade antigênica da superfície de sensor foi realizada com um pulso de 15 s de glicina 6 mM em pH 2, contendo cloridrato de guanidina 6 M, 0,1% (m/v) CHAPS, e 0,1% (v/v) de cada Tween-20, Tween-80 e Triton X-100. Isto foi seguido por uma segunda etapa de regeneração com o tampão de corrida HBS-EP enriquecido com 0,05% (m/v) de CHAPS (concentração final) por 12 s a 100 µL/min.

1.2.6 Análise de monossacarídeo

Metil-glicosídeos (metil-éster) trimetilsililados foram preparados das amostras de glicano por metanólise (HCl metanólico 1,0 M, 24 h, 85°C) seguido por re-N-acetilação e trimetilsililação, e então analisados por cromatografia gasosa / espectrometria de massa como descrito por [Kamerling JP, Vliegthart JFG (1989)]. A análise quantitativa foi realizada por cromatografia gasosa em uma coluna capilar EC-I (30 m x 0,32 mm, Alltech) usando um cromatógrafo a gás Chrompack CP 9002 operado com um programa de temperatura de 140°C para 240°C a 4°C/min, e detecção por ionização de chama. A identificação dos derivados de monossacarídeo foi confirmada por cromatografia gasosa / espectrometria de massa em um sistema Fisons Instruments GC 8060/MD 800 (Interscience) equipado com uma coluna AT-1 (30 m x 0,25 mm, Alltech).

Resultados

Isolamento de LPS

Para a produção de LPS, rendimentos de células bacterianas e de LPS foram comparados com cultura em placa de ágar e crescimento de *Salmonella* em caldo (Tabela 4). Devido a razões técnicas de laboratório, foi decidido coletar bactérias das placas de ágar, em vez do isolamento das células dos frascos de cultura. Os resultados do isolamento de LPS de Se, Sg,

Sl, Sm e St estão sumariados nas Tabelas 5 a 9, respectivamente. O isolamento padronizado de LPS bem definido é determinativo para um ensaio sorológico bem sucedido e robusto. Para garantir desempenho de ensaio diferenças de batelada para batelada devem ser mantidas em um mínimo. Por este motivo, foram produzidas várias bateladas de LPS extraídas de cada Se, Sg, Sl, Sm e St. A recuperação de LPS depende largamente da concentração final de TCA na mistura durante a extração de LPS (cf. Tabela 6 e Tabela 8), embora esta relação não esteja completamente clara para a extração de LPS de St (Tabela 9). De fato, nenhuma concentração de TCA ótima acurada pôde ser determinada para cada tipo de LPS por meio do teste de uma faixa ampla de concentrações de TCA. Aqui, TCA ótimo renderia quantidades de LPS mais altas, e daria respostas de biossensor não específicas mais baixas e sorológicas específicas mais altas. Neste estudo, a concentração de TCA escolhida como 'ótima' para extração de LPS de sorotipos diferentes de *Salmonella* foi baseada nos rendimentos de LPS finais após diálise, e foram 0,12 M, 0,25 M, 0,25 M, 0,25 M e 0,25 M como concentrações finais para Se, Sg, Sl, Sm e St, respectivamente.

Tabela 4. Recuperação de LPS de células de *S. enteritidis* crescidas quer como uma suspensão em um biorreator contendo caldo nutriente #2 (caldo) quer sobre placas de ágar BHI (ágar). LPS foi isolado usando concentrações finais de TCA indicadas. O rendimento de LPS relativo à quantidade de células isoladas é indicado na última coluna

Código de batelada de LPS	Método de cultura	TCA (M)	Rendimento de bactérias (g)	LPS recuperado (mg)	Rendimento de LPS (% , m/m)
Se01	Caldo	0,25	3,9	16	0,42
Se02	Caldo	0,25	5,0	21	0,41
Se03*	Ágar	0,25	14	0,2	0,00
Se04a	Caldo	0,25	3,4	0,4	0,01
Se04b	caldo	0,5	3,4	2	0,06
Se05**	ágar	0,5	7,6	2,4	0,03
Se06a	ágar	0,5	8,8	3,9	0,04
Se06b	ágar	0,25	7,6	9,5	0,12
Se06c	ágar	0,125	8,9	13	0,14
Se07a	ágar	0,1	9,1	12	0,13
Se07b	ágar	0,05	9,2	2,9	0,03

Se07c	ágar	0,025	9,3	4	0,04
Se2003.1	ágar	0,125	29	48	0,16
Se2003.2	ágar	0,125	17	25	0,15
Se2003.4	ágar	0,125	13	5,1	0,04
Se2005.1	ágar	0,25	15	18	0,13

* pH de mistura contendo TCA é remoto

** algum material foi perdido durante o processo de recuperação.

Tabela 5. Recuperação de células de *Salmonella enteritidis* crescidas sobre placas BHla. LPS foi isolado usando concentração final de TCA de 0,12 M

5 (cf. Tabela 4). Rec, recuperado.

Batelada de LPS (Se)	Rendimento bacteriano total (g)	Número de placas BHla	Bactérias por placa(g)	LPS rec./células (% m/m)
Se2003.1	29,09	98	0,29	0,16
Se2003.2	17,27	60	0,28	0,15
Se2003.4	13,00	40	0,32	0,04
Se2005.1	44,5	120	0,37	0,12

Tabela 6. Recuperação de células de *Salmonella goldcoast* crescidas sobre placas BHla. LPS foi extraído usando uma concentração final de TCA como indicado. Rec, recuperado.

Código de batelada de LPS	Rendimento bacteriano total (g)	Número de placas BHla	Bactérias por placa (g)	TCA ^a (M)	LPS rec./células (% m/m)
Sg2003.1	40,39	120	0,34	0,075	0,01
Sg2003.2	35,09	120	0,29	0,25	0,41
Sg2003.3	12,89	40	0,32	0,25	0,36
Sg2005.1	46,99	120	0,39	0,25	0,30 ^b

^a concentração final de TCA na mistura de extração.

10 ^b aproximadamente um terço da produção foi perdido durante a recuperação.

Tabela 7. Recuperação de células de *Salmonella livingstone* crescidas sobre placas BHla. LPS foi extraído usando concentração final de TCA de 0,250 M TCA. Rec, recuperado.

Código de batelada de LPS	Rendimento bacteriano total (g)	Número de placas BHla	bactérias por placa (g)	LPS rec./células (% m/m)
S12003.1	32,89	120	0,27	0,52
S12003.2	13,63	40	0,34	0,51
S12005.1	47,40	120	0,40	0,64

Tabela 8. Recuperação de células de *Salmonella meleagridis* crescidas sobre placas BHla. LPS foi isolado usando uma concentração final de TCA como indicado. Rec, recuperado.

15

Código de batelada de LPS	Rendimento bacteriano total (g)	Número de placas BHI ^a	Bactéria por placa (g)	TCA ^a (M)	LPS rec./células (% m/m)
Sm2003.1a ^b	9,10	30	0,30	0,250	0,32
Sm2003.1b ^b	10,13	30	0,34	0,125	0,19
Sm2003.1c ^b	10,00	30	0,33	0,075	0,06
Sm2003.2 ^b	40,42	120	0,33	0,075	0,02
Sm2003.3	37,28	138	0,27	0,250	0,47

^a concentração final de TCA na mistura de extração.

^b bateladas Sm2003.1 a 2003.2 foram combinadas em uma batelada única chamada de Sm2003.1

Tabela 9. Recuperação de células de *Salmonella typhimurium* crescidas sobre placas BHIa. LPS foi isolado usando uma concentração final de TCA de 0,250 M. Rec, recuperado.

Código da batelada	Rendimento bacteriano total (g)	Número de placas BHIa	Bactérias por placa (g)	TCA ^a (M)	LPS rec./células (% m/m)
St2003.1	28,51	69	0,41	0,125	0,18
St2003.2 ^b	39,21	120	0,33	0,250	0,06
St2003.3 ^b	16,6	56	0,30	0,125	0,09
St2003.4a ^b	18,15	60	0,30	0,250	0,18
St2003.4b ^b	19,2	60	0,32	0,125	0,06
St2005.1	46,80	120	0,39	0,250	0,19

^a concentração final de TCA na mistura de extração.

^b bateladas St2003.2 a St2003.4b foram combinadas em uma batelada única chamada de St2003.2

10 A composição de monossacarídeo de preparações de LPS isolado foram analisadas para revelar a consistência do procedimento de isolamento e purificação para LPS de diferentes crescimentos de *Salmonella*. Tem que ser observado que análises foram realizadas sobre preparações de LPS que estavam prontas para oxidação e por este motivo fortificadas com Hb

15 em níveis que foram determinados mais ótimos para a batelada de LPS testada (veja abaixo). Para este propósito, análises C-FID e GC-MS foram realizadas após metanólise das preparações de LPS fortificadas com Hb (Tabela 10 a Tabela 14). Estes resultados mostram que Hb não contribui para uma quantidade significativa de carboidratos na preparação final de LPS. Análise

20 de BHIa, mostrou a presença de exclusivamente galactose (Gal) e glicose

(Glc). O conteúdo destes monossacarídeos foi 5,6 µg/mg de BHIIa seco. Análises de preparações de LPS de *Salmonella*, demonstraram a ocorrência de Gal, Glc, N-acetil-glicosamina (GlcNAc), glicero-mano-heptose (Hep), ácido 2-ceto-3-desóxi-octônico (KDO), manose (Man) e ramnose (Rha; 6-desóxi-manose) de acordo com suas estruturas de carboidrato. Sua ocorrência relativa foi expressada como uma razão molar para 1,0 Man (como parte da região PS) ou relativa a 3.0 Hep (como parte da região de núcleo). Contudo, deve ser observado que a região de núcleo contém 2 ou 3 resíduos Hep. Ainda mas, GlcNAc pode originar quer de GlcNAc como na unidade repetida de SI LPS, quer de glicosamina (GlcN), que ocorre como dissacarídeo no grupo lipídeo A como estrutura principal para os lipídeos ligados. Gal ocorre na região de núcleo, que está conservada em todos os sorovares de *Salmonella enterica*, e também na região PS de Se, Sg, St e Sm. Nestes casos, é esperado que a razão molar de Gal seja maior do que 1,0 Man, exceto para Sg no qual cada unidade repetida contém 2 resíduos Man. As análises de monossacarídeo não incluíram a detecção de constituintes O-acetilados, fosforil-etanol-aminados ou fosforilados, nem aquele de abequose (Abe; 3,6-didesóxi-xilo-hexose) ou tivelose (Tyv; 3,6-didesóxi-arabinose), que também correm no polissacarídeo e nas regiões de núcleo dos tipos isolados de LPS.

Análises de Se LPS, mostraram a ocorrência de Gal, Man e Rha em uma razão molar de 1,4, 1,0 e 1,2, respectivamente, em batelada Se2003.1, enquanto que esta razão foi 1,1, 1,0 e 0,9, respectivamente, em batelada Se2003.4 (Tabela 5). Esta razão está em boa conformidade com a composição de uma unidade repetida como [Tyv-]Man-Rha-Gal, exceto que a razão de Rha foi significativamente excessivamente alta em batelada Se2003.1. O conteúdo de carboidrato calculado baseando-se nos monossacarídeos determinados, foi significativamente maior em batelada Se2003.4, a saber 241 µg comparado com 123 µg da batelada Se2003.1. Considerando a ocorrência de 2 resíduos GlcN no lipídeo A e um único

resíduo GlcNAc na região de núcleo e um único resíduo Man em cada unidade repetida, o número de unidades repetidas estimado foi 19 e 20 em bateladas Se2003.1 e Se2003.4, respectivamente.

Análise de monossacarídeo de Se2003.1 oxidado demonstra
 5 claramente diferenças significativas com a batelada idêntica não-oxidada (Tabela 10). Em contraste aos dois resíduos GlcN, é esperado que o resíduo GlcAn terminal, não-redutor esteja oxidado na maior parte. Derivados de alditol não foram detectados pela análise de monossacarídeo aplicada e uma quantidade correspondente de GlcNAc-ol não foi determinada. Visto que Gal
 10 e Man na unidade repetida não são suscetíveis à oxidação por periodato, a razão molar de Man na batelada oxidada é normalizada para aquela de Man na batelada não-oxidada. Deve ser notado que ambos os resíduos Gal na região de núcleo são suscetíveis à oxidação e assim a razão total de Gal é afetada. Inspeção da estrutura molecular de Se LPS, sugere que em adição ao
 15 GlcNAc terminal e Gal de núcleo, dissacarídeo terminal KDOII-KDOIII, e HepI conjugado e HepIII terminal também são suscetíveis à oxidação por periodato. De fato, as razões molares destes resíduos de monossacarídeo sugerem a perda de um resíduo Hep e de aproximadamente 1,6 resíduos KDO. Deve ser observado que KDOII pode não ser completamente oxidado
 20 quando este resíduo está conjugado com um grupo fosfotil-etanol-amina.

Tabela 10. Análise de monossacarídeo de LPS de *S. enteritidis* e de LPS de *S. enteritidis* oxidado. LPS foi fortificado com Hb a 15% (m/m). Razões molares foram determinadas baseando-se em dois resíduos GlcN e um resíduo GlcNAc (detectados como três resíduos GlcNAc) presentes nas regiões de
 25 núcleo e de lipídeo A (referidas como NÚCLEO) e baseando-se em um resíduo Man na unidade repetida (referida como UNIDADE). Resíduos GlcNAc e Man normalizados são indicados sublinhados. Conteúdo de carboidrato foi determinado em preparações de LPS de 0,5 mg, exceto análise de monossacarídeo foi realizada em 125 mg de material oxidado.

Monossacarídeo	Razão molar					
	Batelada Se2003.1		Batelada Se2003.1 (oxidada)		Batelada Se2003.4	
	NÚCLEO	UNIDADE	NÚCLEO	UNIDADE	NÚCLEO	UNIDADE
Gal	29,7	1,4	28,7	1,3	26,3	1,1
Glc	6,3	0,3	7,5	0,4	6,9	0,3
GlcNAc	<u>3,0</u>	+	2,2	+	<u>3,0</u>	+
Hep	2,8	+	1,9	+	2,0	+
KDO	3,2	+	1,4	+	2,3	+
Man	21,6	<u>1,0</u>	<u>21,6</u>	<u>1,0</u>	23,5	<u>1,0</u>
Rha	24,8	1,2	24,4	1,1	20,9	0,9
Conteúdo de carboidrato (µg) ^a	123,0		- ^b		241	
Número de unidades repetidas	19		--		20	

^a não inclui a contribuição de resíduos Tyv;

^b Quantidade de material contendo LPS- analisado não foi acuradamente determinada.

Comparado com Se LPS, análise de monossacarídeo de Sg LPS sugere que a estrutura de LPS foi menor à medida que o número de unidades repetidas foi significativamente menor (Tabela 11). A contribuição relativa de Gal de núcleo para PS Gal é por este motivo maior e a razão molar total verificada é 1,5. Em uma maneira similar, a razão molar para Glc verificada é 1,3 (batelada Sg2003.2) e 1,5 (batelada Sg2003.3), enquanto que a razão molar para Rha está de acordo com a estrutura esperada. Contudo parece que a batelada Sg2003.2 contém menos HepIII terminal e KDOIII terminal e portanto poderia oferecer possibilidade menor para imobilização no chip sensor.

Tabela 11. Análise de monossacarídeo de LPS isolado de *S. goldcoast* fortificado com Hb a 50% (m/m). Razões molares foram determinadas baseando-se em dois resíduos GlcN e um resíduo GlcNAc (detectados como três resíduos GlcNAc) presentes nas regiões de núcleo e de lipídeo A (referidas como NÚCLEO) e baseando-se em dois resíduos Man na unidade repetida (referida como UNIDADE). Resíduos GlcNAc e Man normalizados são indicados sublinhado. Conteúdo de carboidrato foi determinado em preparações de LPS de 0,5 mg.

Monossacarídeo	Razão molar			
	Batelada Sg2003.2		Batelada Sg2003.3	
	NÚCLEO	UNIDADE	NÚCLEO	UNIDADE
Gal	15,3	1,5	14,8	1,5
Glc	13,5	1,3	14,3	1,5
GlcNAc	<u>3,0</u>	+	<u>3,0</u>	+
Hep	2,9	+	2,3	+
KDO	3,0	+	2,8	+
Man	20,5	<u>2,0</u>	<u>19,2</u>	<u>2,0</u>
Rha	10,6	1,0	10,2	1,0
Conteúdo de carboidrato (µg) ^a	170		199	
Número de unidades repetidas	9		8	

^a não inclui a contribuição de resíduos Abe.

Normalização do número de resíduos de núcleo de resultados de análise de carboidrato de SI LPS (Tabela 12) foi impedida pela ocorrência de GlcNAc nas unidades repetidas de PS. Quando o número de resíduos Hep foi ajustado em 3,0, ocorreu uma sobreestimativa inaceitável do número de resíduos KDO. Por este motivo, o número de Hep foi ajustado em 2,0, mas pode necessitar ser modificado, de modo que o número de KDO fique próximo de 3,0. Visto que o número de resíduos Man em cada unidade repetida é quatro, razões molares foram corrigidas para 4,0 resíduos Man. Baseando-se em uma razão molar de 4:1 de Man/GlcNAc na região PS, o número de unidades repetidas foi calculado baseando-se nos resíduos Lipídeo A GlcN e GlcNA de núcleo restantes. Este cálculo revelou que o número de unidades repetidas em SI também foi relativamente pequeno, a saber 8 e 10 unidades em batelada S12003.1 e batelada 2003.2, respectivamente.

Tabela 12. Análise de monossacarídeo de LPS isolado de *S. livingstone* fortificado com Hb a 50% (m/m). Razões molares foram determinadas baseando-se em dois resíduos Hep presentes no núcleo (referidos como NÚCLEO) e baseando-se em quatro resíduos Man na unidade repetida (referida como UNIDADE). Resíduos Man e GlcNAc normalizados são indicados sublinhados. Conteúdo de carboidrato foi determinado em preparações de LPS de 0,5 mg, n.d., não detectado.

Monossacarídeo	Razão molar			
	Batelada SI2003.1		Batelada SI2003.2	
	NÚCLEO	UNIDADE	NÚCLEO	UNIDADE
Gal	3,5	0,4	5,1	0,4
Glc	17,4	1,7	23,5	1,6
GlcNAc	14,0	1,4	18,7	1,3
Hep	<u>2,0</u>	0,2	<u>2,0</u>	0,14
KDO	2,7	0,3	2,7	0,2
Man	40	<u>4,0</u>	<u>57</u>	<u>4,0</u>
Rha	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Conteúdo de carboidrato (μg) ^a	212		239	
Número de unidades repetidas	8		10	

Tabela 13. Análise de monossacarídeo de LPS de *S. meleagridis*. Bateladas Sm2003.1 e Sm2003.3 foram fortificadas com 50% (m/m) de Hb. Razões molares foram determinadas baseando-se em dois resíduos GlcN e um resíduo GlcNAc (detectados como três resíduos GlcNAc) presentes nas regiões de lipídeo A e de núcleo (referidas como NÚCLEO) e baseando-se em um resíduo man na unidade repetida (referida como UNIDADE). Resíduos GlcNAc e Man normalizados são indicados sublinhados. Conteúdo de carboidrato foi determinado em preparações de LPS de 0,5 mg.

Monossacarídeo	Razão molar			
	Batelada Sm2003.1		Batelada Sm2003.3	
	NÚCLEO	UNIDADE	NÚCLEO	UNIDADE
Gal	20,4	1,5	22,4	1,4
Glc	7,9	0,6	4,8	0,3
GlcNAc	<u>3,0</u>	+	<u>3,0</u>	+
Hep	2,8	+	2,9	+
KDO	2,8	+	2,9	+
Man	14,2	<u>1,0</u>	15,4	<u>1,0</u>
Rha	16,1	1,1	17,6	1,2
Conteúdo de carboidrato (μg) ^a	170		220	
Número de unidades repetidas	12		13	

^a não inclui a contribuição de grupos O-acetila, que podem estar ligados nos resíduos Gal repetidos.

Análise de monossacarídeo de Sm LPS (Tabela 13) mostrou uma composição completamente diferente como aquela para SI LPS de acordo com sua estrutura molecular contendo unidades repetidas Man-Rha-Gal. Como descrito acima, a razão molar para Gal é maior do que o esperado

1,0 na unidade repetida parcialmente pela contribuição de resíduos Gal na região de núcleo.

Igualmente, razões equimolares são esperadas para Glc, Man, Rha e Gal porque estes resíduos formam uma unidade repetida em St LPS (Tabela 14). Aqui deve ser observado que abequose também é parte da unidade repetida, mas não é aplicada na análise. Batelada St2003.2, contudo, contém KDO e Hep menos oxidável, que pode afetar a eficácia da imobilização de LPS desta preparação. Por outro lado, batelada St2003.2 contém muito mais carboidrato do que a batelada St2003.1, a saber 249 µg em relação a 154 µg em 0,5 mg de LPS, respectivamente.

Tabela 14. Análise de monossacarídeo de LPS de *S. typhimurium*. Bateladas St2003.1 e St2003.2 foram fortificadas com Hb a 15% (m/m) e 25% (m/m), respectivamente. Razões molares foram determinadas baseando-se em dois resíduos GlcN e um resíduo GlcNAc (detectados como três resíduos GlcNAc) presentes nas regiões de lipídeo A e de núcleo (referidas como NÚCLEO) e baseando-se em um resíduo Man na unidade repetida (referida como UNIDADE). Resíduos GlcNAc e Man normalizados são indicados sublinhados. Conteúdo de carboidrato foi determinado em preparações de LPS de 0,5 mg.

Monossacarídeo	Razão molar			
	Batelada St2003.1		Batelada St2003.2	
	NÚCLEO	UNIDADE	NÚCLEO	UNIDADE
Gal	24,7	1,4	24,2	1,4
Glc	17,0	1,0	16,2	1,0
GlcNAc	<u>3,0</u>	+	<u>3,0</u>	+
Hep	2,8	+	2,6	+
KDO	2,7	+	2,4	+
Man	20,5	<u>1,0</u>	19,2	<u>1,0</u>
Rha	19,9	1,1	19,5	1,2
Conteúdo de carboidrato (µg) ^a	154		249	
Número de unidades repetidas	15		14	

^a não inclui a contribuição de resíduos Abe (O-acetilados).

Imobilização de LPS suportado em proteína

Surpreendentemente, LPS intacto insatisfatoriamente copulou

por meio de sua função ácido carboxílico-KDO em dextrano carboximetilado ativado por EDC/NHS, e respostas significativas de soros de referência não foram obtidas. Para melhorar a imobilização de LPS no chip sensor, LPS foi oxidado usando periodato de sódio para criar grupos aldeído reativos em seus

5 constituintes carboidrato, que permitiriam o denominado procedimento de copulação de aldeído, i.e. condensação de aldeído com uma função hidrazida em uma ligação hidrazona seguida por redução para um produto hidrazida. Sem oxidação, LPS tinha de fato pouco potencial para imobilizar em uma superfície de um chip CM5 revestido com carbohidrazida (resultados não

10 mostrados).

Copulação de LPS oxidado, contudo, deu reatividade desapontadora com soros de referência, provavelmente como um resultado de imobilização insuficiente dos antígenos. LPS extraído em fenol comercialmente adquirido (i.e. clivagem de lipídeo A), de *S. enteritidis* deu

15 respostas baixas quando imobilizado após oxidação, a saber 187 RU e 167 RU, respectivamente. Tem que ser observado, contudo, que além da copulação insatisfatória, oxidação pode ter destruído uma parte das estruturas antigênicas, que pode dar respostas sorológicas insatisfatórias. O grau de oxidação foi investigado pela análise de monossacarídeo de Se LPS (Tabela

20 10). Esta análise revelou que quantidades relativas de KDO, Hep e GlcNAc, que são constituintes da região de núcleo e não das unidades antigênicas repetidas na parte PS, foram significativamente reduzidas comparado com Se LPS não oxidado. O importante é que parte de resíduos de monossacarídeo de PS, e portanto estruturas antigênicas, aparentemente permaneceram intactos

25 sob as condições de oxidação suaves, que foram aplicadas.

Tabela 15. Respostas de biossensor após imobilização e respostas de anti-soros de referência fluídos sobre superfície de chip, que foram preparados com Se ou St LPS oxidado e não oxidado na presença de 15% (m/m) de Hb porcina.

Tipo de LPS	Tratamento com periodato	Resposta de biossensor (RU)					
		Nível de imobilização	α -O4 ^a	α -O5	α -O9	α -O12	O poly A-S
Se	Não	6515	1	9	6	9	4
St	Não	4402	2	156	1	5	0
Se	sim	4265	-21	-3	77	202	159
St	sim	5950	302	5005	-12	225	137

^a anti-soro contra antígeno O indicado foi testado

Tabela 16. Respostas de biossensor após imobilização e respostas de anti-soros de referência fluídos sobre superfície de chip, que foram preparados com St LPS oxidado (batelada St2003.1) na presença de 7% (m/m) da proteína indicada.

Proteína adicionada	Resposta de biossensor (RU)											
	Nível de Imob. ^a	O4	O5	O9	O12	O poly E	O poly A-S	C-SPF	C-St	C-Se	C-Si	S-Spg
BSA ^b	344	n.dc	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BSA	7450	19	216	1	18	4	14	5	18	21	12	42
Hb	3410	319	3874	4	192	3	203	11	151	140	51	762
Mb	815	59	773	3	45	2	47	8	46	34	20	152
Ob	5540	76	926	10	56	12	56	12	47	45	25	177

^a nível de imobilização;

^b BSA foi adicionado em LPS oxidado e dessalinizado;

^c imobilização de LPS foi considerada muito baixa para outra análise de soros de referência.

10 Para otimizar a ligação de LPS e conseqüentemente melhorar a detecção de anticorpos ligantes dos soros, oxidação de LPS foi então executada na presença de uma proteína para permitir a formação de complexos de proteína-LPS por meio de reações de base de Schiff entre aminas proteináceas e funções aldeído de LPS. De fato, Se LPS extraído de

15 TCA comercialmente disponível, contendo quantidades consideráveis de proteínas bacterianas, deu imobilização melhorada a 562 RU comparado com Se LPS extraído em fenol e purificado por cromatografia de troca iônica a 208 RU.

20 Oxidação de LPS foi necessária, porque misturas contendo LPS não oxidado e proteína mostraram níveis de imobilização relativamente

altos mas respostas específicas insignificantes (Tabela 15). Em adição, adição de proteína foi apenas benéfica antes da oxidação de LPS, porque a adição de BSA em St LPS oxidado e dessalinizado deu níveis de imobilização aceitáveis mas não respostas sorológicas esperadas (Tabela 16). Em uma
5 maneira similar, Hb deu níveis de imobilização relativamente altos mas não respostas sorológicas, como esperado (resultados não mostrados).

Para propósitos de melhoria de método, proteínas com grau relativamente alto de homologia de suas estruturas primária e secundária entre espécies de vertebrado homeotérmicas e ocorrendo em matrizes adequadas
10 para sorologia foram selecionadas para investigações adicionais. Por este motivo, foram comparados os desempenhos de St LPS fortificado (7% m/m) com ovalbumina de galinha, hemoglobina *porcina*, albumina de soro *bovino* ou mioglobina *porcina* (Tabela 16). Hemoglobina deu melhoria claramente melhor de níveis de imobilização juntamente com melhor perfil de reatividade
15 de anticorpo - antígeno esperado. Na presença de Hb, em particular, soros de referência O12, poly O A-S e C-St deram respostas melhores.

Este experimento foi repetido com a adição de BSA, Hb e Mb em níveis indicados em Tabelas 17 a 20 usando bateladas Se2005.1, Sg2005.1, S12005.1 e St2005.1. Nesta vez, O4 e O5 ligaram em St LPS
20 imobilizado como esperado (Tabela 20). Avaliação destes resultados sumariados nas Tabelas 16 a 20 revelaram que quando se consideram todas as respostas esperadas simultaneamente por tipo de LPS, a adição de Hb deu respostas específicas mais altas comparado com a adição de BSA e Mb. Além disso, na maioria dos casos desvios padrão que ocorreram com Hb como
25 proteína suportadora, foram mais favoráveis do que aqueles para a adição de BSA e Mb. Hemoglobina foi, portanto, selecionada para experimentação adicional.

Foi observado que os anti-soros O poly A-S provavelmente contêm títulos baixos de anti-sorogrupo C₁ e C₂, como no caso de teste de Sg

LPS imobilizado (Tabela 18) e de SI LPS (Tabela 19) foram encontradas respostas relativamente baixas.

Tabela 17. Respostas de biossensor em unidades de resposta (RU) após imobilização e respostas de anti-soros de referência fluídos sobre superfícies de chip, que foram preparados com Se LPS oxidado na presença de 15% (m/m) de proteína indicada. Valores foram corrigidos para as respostas de C-SPF, que também estão listadas. Desvios padrão estão indicados entre parênteses (JV = 5, exceto para soros de galinha e suíno JV= 4).

Proteína	Nível de Imob. ^a	Anti-soro testado								
		O9	O12	O poly A-S	Anti-soro grupo D	C-Se	C-St	C-Spg	P-St	C-SPF
Hb	3403	72 (4)	268 (1)	160 (2)	187 (3)	197 (6)	55 (7)	1753 (5)	76 (13)	87
Mb	4228	47 (4)	242 (3)	133 (5)	158 (4)	167 (9)	40 (12)	1674 (6)	80 (16)	107
BSA	4883	31 (11)	185 (2)	99 (16)	126 (5)	126 (11)	28 (30)	1277 (4)	68 (24)	74

^a nível de imobilização.

Tabela 18. Respostas de biossensor em unidades de resposta (RU) após imobilização e respostas de anti-soros de referência fluídos sobre superfícies de chip, que foram preparados com Sg LPS oxidado na presença de 50% (m/m) de proteína indicada. Valores foram corrigidos para as respostas de C-SPF, que também estão listadas. Desvios padrão estão indicados entre parênteses (JV = 5, exceto para soros de galinha e suíno N= 4).

Proteína	Nível de Imob. ^a	Anti-soro testado					
		O6,7	O8	O poly A-S	Anti-soro grupo C	P-SI	C-SPF
Hb	5542	318 (1)	249 (11)	69 (3)	145 (10)	52 (17)	-1
Mb	9880	237 (1)	211 (12)	45 (7)	81 (26)	162 (34)	0
BSA	10344	196 (4)	124 (8)	19 (24)	61 (15)	110 (22)	-6

^a nível de imobilização.

Tabela 19. Respostas de biossensor em unidades de resposta (RU) após imobilização e respostas de anti-soros de referência fluídos sobre superfícies de chip, que foram preparados com SI LPS oxidado na presença de 50% (m/m) de proteína indicada. Valores foram corrigidos para as respostas de G-SPF, que também estão listadas. Desvios padrão estão indicados entre parênteses (N= 5, exceto para soros de galinha e suíno N = 4).

Proteína	Nível de Imob. ^a	Anti-soro testado					
		O6,7	O poly A-S	Anti-soro grupo C	C-Si	P-Si	C-SPF
Hb	8180	125 (21)	16	167 (4)	377 (12)	46 (7)	-17
Mb	10819	97 (24)	8	115 (0)	349 (3)	96 (26)	-24
BSA	11364	24 (5)	-33	40 (5)	200 (2)	68 (20)	76

^a nível de imobilização

Tabela 20. Respostas de biossensor em unidades de resposta (RU) após imobilização e respostas de anti-soros de referência fluídos sobre superfícies de chip, que foram preparados com St LPS oxidado na presença de 15% (m/m) de proteína indicada. Valores foram corrigidos para as respostas de C-SPF, que também estão listadas. Desvios padrão estão indicados entre parênteses (N = 5, exceto para soros de galinha e suíno JV= 4).

Proteína	Nível de Imob. ^a	Anti-soro testado								
		O4	O5	O	O poly A-S	Anti-soro grupo B	C-St	C-Spg	P-St	C-SPF
Hb	3355	419 (3)	494 (7)	212 (2)	107 (1)	809 (5)	398 (14)	619 (24)	272 (5)	9
Mb	2826	353 (8)	432 (4)	176 (8)	80 (9)	722 (2)	356 (20)	532 (24)	246 (14)	17
BSA	5588	388 (7)	304 (7)	158 (16)	82 (16)	542 (4)	324 (24)	324 (16)	244 (17)	4

^a nível de imobilização.

Níveis de imobilização e reatividade esperada de soros de aglutinação com LPS de *S. enteritidis* (batelada Se2003.1), *S. goldcoast* (batelada Sg2003.2), *S. livingstone* (batelada S12003.1), *S. typhimurium* (batelada St2003.1) e *S. meleagridis* (Batelada Sm2003.1) revelaram uma correlação com quantidade relativa de Hb adicionada antes da oxidação (veja por exemplo Figura 3). Também foi verificado que para um tipo de LPS específico de sorovar de *Salmonella*, a concentração ótima de Hb também foi dependente da batelada de produção.

Orientando-se pela resposta máxima do perfil antigênico esperado usando um painel de soros de controle de referência e padrão e orientando-se pelas respostas baixas de soros de referência de SPF de ave,

concentração ótima de Hb foi determinada para cada tipo e para cada batelada de LPS (Tabela 21). No texto, preparações de LPS contendo hemoglobina, oxidadas, são adicionalmente referidas como preparações LPS^{ox}-Hb.

Deve ser observado que, em qualquer experimento, o nível de imobilização não se correlaciona com respostas sorológicas mas se correlaciona com a quantidade de Hb que foi adicionada.

Tabela 21. Efeito de concentração de LPS e de hemoglobina sobre o nível de imobilização final de LPS derivado de *S. enteritidis* (Se) e de *S. typhimurium* (St).

Concentração de LPS (µg/mL)	Se LPS		St LPS	
	10% (m/m) Hb ^a	15% (m/m) Hb	10% (m/m) Hb	15% (m/m) Hb
25				9197
62,5 ^b	2194-2065	3173		
62,5 ^b	3400-3000			
62,5 ^b			8414	
62,5 ^b	2374			
125	3940-3647			
250	3370		10645	

^a concentração de Hb relativa a LPS

^b preparado sobre canais de sensor separados.

O efeito da diluição de Se LPS e St LPS antes da oxidação na presença de 10% (m/m) ou 15% (m/m) de Hb em relação a LPS, respectivamente, foi investigado (Tabela 21). Estes resultados não revelaram claramente uma correlação entre concentração de LPS e o nível de copulação.

Tabela 22. Relação entre o nível imobilizado de LPS^{ox}-Hb e as respostas sorológica de anti-soro de antígeno O e soros de controle de ave. Campos para os quais uma resposta sorológica era esperada estão sombreados em uma cor verde e valores dentro do campo estão sublinhados. Soros de controle foram diluídos em HBS-EP contendo cloreto de sódio 0,5 M e 0,5% (m/v) de dextrano carboximetilado.

Código de batelada de LPS	Nível de imobilização (RU)	Soros de controle (1:20, v/v)					
		O poly A-SI	C-SPF	C-Se	C-St	C-Spg	C-Si
Se2003.1	2083	<u>253</u>	24,9	<u>1705,9</u>	122,5	<u>4950,4</u>	58,4
	716	<u>95,8</u>	14,9	<u>681,6</u>	56,4	<u>1647,4</u>	29,1
	450	<u>48,9</u>	9,3	<u>353,5</u>	31,2	<u>733,0</u>	17,0
	292	<u>17,4</u>	10,0	<u>89,3</u>	15,2	<u>195,3</u>	10,8
Sg2003.2	8709	<u>180,0</u>	27,2	151,1	53,9	136,8	<u>184,4</u>
	8017	<u>181,3</u>	29,4	149,4	50,9	137,6	<u>186,1</u>
	6075	<u>205,0</u>	29,1	193,5	48,3	129,7	<u>206,4</u>
	3793	<u>155,4</u>	25,7	144,5	39,1	98,9	<u>157,9</u>
SI2003.1	11526	<u>83,2</u>	51,1	69,8	76,1	115,6	<u>3708,2</u>
	11329	<u>90,3</u>	54,3	74,7	76,6	121,0	<u>3832,5</u>
	8357	<u>97,7</u>	54,8	77,3	66,8	111,9	<u>4000,1</u>
	6067	<u>88,5</u>	51,7	73,0	61,3	104,4	<u>3815,1</u>
St2003.1	2831	<u>175,0</u>	32,2	466,8	<u>607,3</u>	<u>1762,3</u>	147,4
	543	<u>48,1</u>	16,9	119,9	<u>174,9</u>	<u>369,3</u>	58,1
	321	<u>26,2</u>	11,2	64,8	<u>97,5</u>	<u>179,1</u>	36,5
	217	<u>12,2</u>	12,1	18,9	<u>28,8</u>	<u>46,0</u>	15,8

Estabilidade e robustez de imobilização de LPS

Reprodutibilidade e repetibilidade da imobilização de LPS e a resposta específica de soros de referência foram testados. As preparações de LPS de Se, Sg, SI e St foram oxidadas na presença de sua correspondente concentração ótima de Hb, dessalinizadas, e então armazenadas em solução a 4°C no escuro. Sob condições idênticas, mas considerando a variabilidade geralmente observada para imobilização de moléculas em uma superfície de biossensor, os níveis de imobilização de LPS oxidado foram quer comparáveis nos casos de bateladas SI (5% RSD) e St (8% RSD) quer tenderam a aumentar nos casos das bateladas Se (13% RSD) e Sg (8% RSD) durante dois meses de armazenagem (Tabela 23 até Tabela 26). As respostas de soros de referência também foram provadas sobre os chips de biossensor separados. Inspeção destes não revelou uma correlação entre o nível de imobilização e a resposta específica. Por exemplo, níveis de imobilização de Se LPS e Sg LPS podem tender a aumentar no decorrer do tempo; este aumento não foi refletido na resposta de ligação de anticorpos de soro nos antígenos imobilizados. O desvio padrão relativo varia entre 12% e 38%. Quando se consideram os primeiros 3 dias de medida (dia 0, dia 7 ou 10, e dia 14 ou 17) a variância é grandemente reduzida de 3,5% para 23% (resultados

não mostrados). Tabelas 27 a 30 sumarizam a repetibilidade do método em vários momentos durante um período de 12 meses. Em cada instante de tempo de análise, uma alíquota fresca de LPS fortificado com Hb foi oxidada, imobilizada e analisada e portanto reflete a soma de variabilidade de várias etapas.

Tabela 23. Resposta de anti-soros de aglutinação e de referência com LPS^{ox}-Hb Se2003.1 preparados no dia 0 e armazenados a 5-8°C. A preparação de LPS foi imobilizada e testada após oxidação nos dias indicados.

Dias de análise	Nível de imobilização (RU)	Se2003.1 oxidado na presença de 15% de Hb				
		O9	O12	O poly A-S	C-Se	C-Spg (1:100)
0	2708	446	302	330	2597	3535
10	3007	352	258	252	2205	3726
17	3194	472	320	292	2520	3586
31	3642	509	356	340	1486	3727
62	3640	361	223	156	1676	2329
Média	3238	428	292	274	2097	3381
Desvio padrão	407	69	52	74	498	594
RSD (%)	13	16	18	27	24	18

Tabela 24. Resposta de anti-soros de aglutinação e de referência com LPS^{ox}-Hb Sg2003.2 preparados no dia 0 e armazenados a 5-8°C. A preparação de LPS foi imobilizada e testada após oxidação nos dias indicados.

Dias de análise	Nível de imobilização (RU)	Sg2003.2 oxidado na presença de 50% de Hb		
		O6,7	OS	O poly A-S
0	7262	668	465	117
7	9972	714	531	110
14	10597	657	566	111
20	11453	857	502	100
28	11866	1085	504	130
59	12002	484	364	58
Média	10525	744	489	104
Desvio padrão	869	226	77	27
RSD (%)	8	30	16	26

Tabela 25. Resposta de anti-soros de aglutinação e de referência com LPS^{ox}-Hb S12003.1 preparados no dia 0 e armazenados a 5-8°C. A preparação de LPS foi imobilizada e testada após oxidação nos dias indicados.

Dias de análise	Nível de imobilização (RU)	S12003.1 oxidado na presença de 50% de Hb	
		O6,7	O poly A-S
0	11509	318	84
7	13581	289	63
14	14870	250	54
20	13582	475	65

28	14976	468	75
59	14744	202	31
Média	13877	334	62
Desvio padrão	707	127	17
RSD (%)	5	38	27

Tabela 26. Resposta de anti-soros de aglutinação e de referência com LPS^{ox}-Hb St2003.1 preparados no dia 0 e armazenados a 5-8°C. A preparação de LPS foi imobilizada e testada após oxidação nos dias indicados.

Dias de análise	Nível de imobilização (RU)	St2003.1 oxidado na presença de 15% de Hb						
		O4	O5 (1:200)	O12	O poly A-S	C-St	C-Se	C-Spg (1:100)
0	5391	594	540	278	362	441	544	1634
10	4432	463	567	242	273	448	356	1442
17	4473	517	578	250	262	362	396	1294
31	4769	559	582	296	326	440	255	1464
62	4996	442	321	209	196	340	297	983
Média	4812	515	518	255	284	406	370	1363
Desvio padrão	397	64	111	34	64	51	112	244
RSD (%)	8	12	22	13	22	13	30	18

Tabela 27. Respostas de Se LPS recém-oxidado (batelada Se2003.1) nos instantes de tempo indicados (em meses). O LPS foi isolado de células bacterianas, fortificado com 15% (m/m) de Hb, seco e armazenado a 4-7°C até o dia de oxidação, imobilização e análise.

Análise (mês)	Nível de imobilização (RU)	Se2003.1 oxidado na presença de 15% de Hb				
		O9	O12	O poly A-S	C-Se (1:200, v/v)	C-Spg (1:100, v/v)
0	2708	446	302	330	2597a	3535b
1 ^c	1326	252	165	172	464	1274
2	2380	372	262	230	502	1478
3	2003	398	208	230	676	1864
5	2309	144	207	337	534	1539
7	3487	240	444	547	786	2368
9	3721	215	407	576	705	2415
12	1450	78	145	219	159	1272

^a soro foi diluído 1:50 (v/v)

^b soro foi diluído 1:100 (v/v)

^c LPS foi diluído em outra razão volumar

Tabela 28. Respostas de Sg LPS recém-oxidado (batelada Sg2003.2) nos instantes de tempo indicados (em meses). O LPS foi isolado de células bacterianas, fortificado com 50% (m/m) de Hb, seco e armazenado a 4-7°C até o dia de oxidação, imobilização e análise.

Análise (mês)	Nível de imobilização (RU)	Sg2003.2 oxidado na presença de 50% de Hb		
		O6,7	O8	O poly A-S
0	7262	668	465	117
1	7428	929	451	100
2	9023	639	459	91
3	13152	474	606	119
5	8087	549	446	294
7	9724	622	382	286
9	8870	692	508	364
12	7088	491	*	281

Tabela 29. Respostas de SI LPS recém-oxidado (batelada SI2003.1) nos instantes de tempo indicados (em meses). O LPS foi isolado de células bacterianas, fortificado com 50% (m/m) de Hb, seco e armazenado a 4-7°C até o dia de oxidação, imobilização e análise.

Análise e (mês)	Nível de imobilização (RU)	SI2003.1	
		O6,7	O poly A-S
0	11509	318	84
1	11442	417	62
2	12280	287	55
3	13152	231	65
5	11896	217	159
7	11563	271	149
9	10882	298	191
12	10138	204	131

- 5 **Tabela 30.** Respostas de St LPS recém-oxidado (batelada St2003.1) nos instantes de tempo indicados (em meses). O LPS foi isolado de células bacterianas, fortificado com 15% (m/m) de Hb, seco e armazenado a 4-7°C até o dia de oxidação, imobilização e análise.

Análise (mês)	Nível de imobilização (RU)	St2003.1 oxidado na presença de 15% de Hb					
		O4	O5 (1:200 v/v)	O12	O poly A-S	C-St	C-Spg (1:200 v/v)
0	5391	594	540*	279	362	441	1634a
1 ^b	3487*	339	470	181	207	352	597
2	4623	482	325	257	242	411	612
3	4079	425	608	187	235	982	624
5	6873	359	369	167	302	393	605
7	5410	681	734	334	453	559	837
9	4008	638	664	278	441	524	824

^a soro foi diluído 1:100 (v/v);

- 10 ^b Após oxidação, solução contendo LPS foi diluída duas vezes em vez de uma.

Exemplo 2

Introdução

Biossensor SPR para detecção de anticorpos de gema de ovo refletindo Salmonella enteritidis

5 *Salmonella* é uma das causas maiores de gastroenterite bacteriana de humanos (Fischer, 2004; van Duynhoven et al., 2005). Nos Países-Baixos, entre 1994-1998, *Salmonella enterica* sorovar *enteritidis* (S.e.) foi o sorovar muito mais freqüentemente isolado (Pelt et al. 1999). Dentro deste sorovar, ovos e produtos de ovo foram a fonte de infecção mais importante. Apesar das várias medidas de controle, aproximadamente 9% dos rebanhos de galinhas poedeiras holandesas tornam-se anualmente infectados. Visto que contaminação de ovo com *Salmonella* continua a ser uma ameaça para a saúde pública, é importante detectar uma infecção de um rebanho tão cedo quanto possível por um programa de vigilância adequado.

15 O corrente sistema de monitoração holandês em galinhas poedeiras é baseado em sorologia (Bokkers, 2002). O objetivo é reduzir a prevalência de S.e. e de *S. typhimurium* no setor de galinhas poedeiras. Amostragem, contudo, ocorre apenas duas vezes: antes e no final do período de postura de ovos. O programa de vigilância corrente, portanto, não pode detectar todas as infecções de rebanhos durante o período de postura de ovos, e os fazendeiros não podem ‘garantir’ que seus produtos são de galinhas poedeiras livres de *Salmonella*.

25 Conseqüentemente, o programa de vigilância deve ser melhorado. Como uma alternativa à corrente sorologia, teste de ovos para anticorpos poderia ser realizado. Amostragem de ovos possui a vantagem de que ela pode ser realizada em instalações de embalagem de ovos, em uma freqüência de amostragem alta com tamanhos de amostra grandes.

Testes para detecção de anticorpo em ovos têm sido antes desenvolvidos e usados. Os testes existentes são freqüentemente baseados em

ensaios imunoabsorvente ligados à enzima (ELISA) usando (combinações de) componentes antigênicos diferentes de *Salmonella* spp. (veja por exemplo Refs. Gast et al, 2002 e 1997; Skov et al, 2002; Holt et al, 2000; Desmidt et al., 1996; Sachsenweger et al, 1994; Van Zijderveld et al, 1992).

5 Recentemente, a adequabilidade possível de biossensores para a detecção de resposta humoral tem sido reconhecida (Bergwerff e van Knapen, 2006, aceito para publicação; Bergwerff e van Knapen, 2003; Jongerius-Gortemaker, 2002; Pyrohova et al, 2002; Vetcha et al., 2002; Li et al, 2002; Liu et al, 2001; Uttenthaler et al. 1998). Um biossensor consiste de um ligante
10 biológico imobilizado reutilizável que ‘sente’ o analito, e um transdutor físico, que traduz este fenômeno em um sinal eletrônico (Jongerius-Gortemaker et al, 2002). O uso de biossensores promete a possibilidade de análises de rendimento alto, e assim a detecção de múltiplos sorovares ou sorogrupos dentro de uma família de anticorpos ou agentes de doenças
15 infecciosas contra estes agentes em uma única corrida. Isto oferece a oportunidade para melhorar programas de vigilância, porque mais amostras podem ser testadas em uma frequência mais alta durante um período de postura de ovos.

Este exemplo avalia a sensibilidade, a especificidade e a
20 capacidade discriminatória de um teste de detecção de anticorpo por biossensor de ressonância de plasmon de superfície (SPR) (biacore 3000) em uma gema de ovo baseado no lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella enterica* de sorovar *enteritidis* e compara os resultados com aqueles obtidos com um kit de teste de ELISA comercial baseado em *g,m flagellin* e um kit de
25 teste de ELISA comercial baseado em LPS para detecção de anticorpos de ovo pela criação e análise de curvas características de operador receptor (ROC).

2. Materiais e métodos

2.1 Método de biossensor de SPR

Adaptamos o método de detecção por ressonância de plasmon de superfície (biacore 3000 por Biacore AB, Uppsala, Suécia) de anticorpos de soro contra *Salmonella enteritidis* usando antígeno LPS como desenvolvido por Bergwerff et al. (em preparação) para gema de ovo. O primeiro ajuste para este método foi feito na preparação da amostra. Após a separação da gema de ovo e da clara de ovo, a gema de ovo foi diluída 1:5 (v/v) em tampão HEPES 10 mM em pH 7,4, contendo EDTA 3 mM, cloreto de sódio 0,15 M, 0,005 % (v/v) de tensoativo P20 (Biacore AB, Suécia), e cloreto de sódio 0,85 M adicional (Merck, Darmstadt, Alemanha), 1% (m/v) de dextrano carboximetilado (Fluka Chemie, Buchs, Alemanha) e 0,05 % (v/v) de Tween 80 (Merck, Alemanha). Foi misturado com pérolas de vidro, centrifugado a 15.000 g na temperatura ambiente por 25 min; e tensoativo foi filtrado sobre um filtro de 0,45 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemanha).

Uma segunda adaptação foi a limpeza do chip sensor. Após análise de 15 amostras de gema de ovo, um solvente contendo 0,5 % (p/v) de dodecil-sulfato de sódio (Biacore AB, Suécia) foi injetado para remover componentes de gema de ovo depositados.

2.2 Gemas de ovo e soros de referência

Soros foram usados como referência nos vários testes devido à invariabilidade do estoque de amostra de gemas de ovo de referência bem definidas. Soros de referência e SPF definidos, liofilizados originários de galinhas infectadas com a) *S. enteritidis*, b) *S. typhimurium*, c) *S. infantis*, ou d) *S. pullorum* foram obtidos do Animal Health Service Ltd. (Deventer, Países-Baixos). Estes soros foram preparados dos soros reunidos. Antes do uso, soros liofilizados foram reconstituídos em 1 mL de Milli-Q. Adicionalmente, anti-grupo B, anti-grupo C, anti-grupo D e anti-grupo E de anticorpo monoclonal de camundongo anti-*Salmonella* foram usados (Sifin, Berlim, Alemanha).

Gemas de ovo de controle interno foram usadas para

estabelecer repetibilidade e sensibilidade analítica do ensaio de biossensor. Consistiram de uma amostra de gema de ovo livre de patógeno específico (SPF) (Animal Health Service Ltd., Países-Baixos) e uma amostra de folículo pré-ovulatório elevadamente imuno-responsiva originária do experimento 2 (cf. seção 2.4. abaixo).

2.3 ELISA

Amostras foram ensaiadas usando técnicas de imunoensaio de enzima de sanduíche. Dois kits de detecção de anticorpo de S.e. comercialmente disponível foram usados; Flockscreen S.e. Guildhay (Guildford, Inglaterra) e FlockChek S.e. IDEXX (Westbrook, Maine, USA). As amostras foram analisadas de acordo com os procedimentos da companhia.

O Guildhay S.e. indirect ELISA é baseado em LPS como antígeno. As cavidades de placas de microtítulo foram revestidas com LPS, diluições de 1:500 de amostras foram adicionadas em mono. Resultados de teste foram expressados como uma razão S / P de acordo com a seguinte fórmula:

(densidade óptica da amostra - densidade óptica de controles negativos)

$$S / P = \frac{\text{densidade óptica da amostra} - \text{controles negativos de densidade óptica}}{\text{controles negativos de densidade óptica}} \quad (1)$$

A razão S / P foi interpretada usando os seguintes critérios: Gema de ovo: $S / P \leq 0,08$ = imuno-negativo; $0,08 < S / P < 0,25$ = imuno-suspeito; $S / P > 0,25$ = imuno-positivo.

O IDEXX S.e. competitive ELISA é baseado em antígeno *g,m flagellar*. As cavidades das placas de microtítulo foram revestidas com antígeno *g,m flagellar*, diluições 1:2 de amostras foram adicionadas em mono. Os resultados foram expressados como razão S / N como segue:

$$S / N = \frac{\text{amostra de densidade óptica}}{\text{controles negativos de densidade óptica}} \quad (2)$$

A razão S / N foi interpretada usando os seguintes critérios:
 Geme de ovo: $S / N \geq 0,75$ = imuno-negativo; $0,75 < S / N < 0,59$ = imuno-suspeito; $S / N \leq 0,59$ = imuno-positivo.

2.4 Experimentos

5 As amostras de ovo usadas neste estudo originaram-se de dois experimentos de infecção.

Experimento 1. Quinze galinhas poedeiras de uma semana de idade (Isa Brown) foram alojadas em isoladores de filtro de ar particulado de eficiência alta de pressão negativa (HEPA) com um volume de
 10 $1,3 \text{ m}^3$ e equipado com um piso de tela de $1,1 \text{ m}^2$, e aplicando um ritmo de fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os isoladores foram ventilados em uma vazão de aproximadamente $30 \text{ m}^3/\text{h}$. Durante o período de crescimento, nenhuma *Salmonella* pôde ser cultivada da forragem. As galinhas foram proporcionadas com alimentação não-medicada e água *ad libitum*.
 15 Foram alojadas, manuseadas e tratadas conforme aprovação do comitê de Dutch Animal Health Service Ltd. de acordo com as regulações holandesas sobre animais experimentais. Todas as galinhas foram inoculadas oralmente uma vez com 1×10^8 CFU por ave em semana 20 do experimento usando *S. enteritidis* CL344 (Animal Health Service Ltd., Deventer, Os
 20 Países-Baixos). Antes e após a inoculação, os ovos foram colhidos em uma base diária, mas não rotulados individualmente e não datados. Os ovos foram armazenados na temperatura ambiente por quatro semanas e subseqüentemente a 4°C . O experimento terminou na semana 22 e produziu 147 amostras ‘positivas’ e 71 amostras ‘negativas’.

25 **Experimento 2.** Este experimento é descrito em detalhe por Van Eerden et al. (2005, em preparação). Resumidamente, 128 galinhas poedeiras de 15 semanas de idade (Lohmann Brown, 16 aves, 8 replicações) foram divididas em dois grupos (8 galinhas cada) e alojadas individualmente em duas células de aclimação, usadas como isoladores, na mesma sala, sob

um ritmo de fotoperíodo de 9 h de luz e 12 h de escuro. Durante o período de crescimento até inoculação, nenhuma *Salmonella* foi cultivada das fezes. Foram proporcionadas com alimento não-medicado e água *ad libitum*. O experimento animal foi conduzido de acordo com as Guidelines for Animal Experimentation of Wageningen University e aprovado pelo Ethical Committee sob o Número de Referência de 2003219. Cada uma de sessenta e quatro galinhas (16 aves, 4 replicações) foi inoculada oralmente uma vez com 1×10^8 CFU de S.e. resistente a ácido nalidíxico (ASG, Lelystad, Os Países-Baixos) uma semana após o início do experimento. As outras 64 aves foram consideradas controles não infectados. Ovos foram colhidos no dia 21 e no dia 28 após inoculação. Doze vezes, os ovos de uma célula aclimatadora foram colhidos e reunidos após fendilhamento da casca (cf. seção 2.5 abaixo). Quatro das amostras de ovos reunidas foram retiradas das células de aclimação ‘não-infectadas’. A gema de ovo e clara de ovo foram misturadas e armazenadas a -20°C . O experimento terminou quatro semanas após a inoculação. Folículos pré-ovulatórios foram então colhidos de oito aves individuais não infectadas e de cinco aves individuais infectadas.

2.5 Preparação de amostras de ovo

Ovos do experimento 1 foram preparados na seguinte maneira. Para facilitar a preparação asséptica, as cascas de ovo foram desinfetadas com um etanol aquoso 70 % (v/v). Subseqüentemente, os ovos foram quebrados, e os conteúdos foram coletados em placas de Petri estéreis. Um volume de 1 mL de gema de ovo foi coletado usando uma seringa estéril descartável e dividido em frações de 200 μL . Cada fração foi diluída com um tampão apropriado quer para biossensor SPR quer para análise de ELISA, e então armazenada a -20°C .

Igualmente, gema de ovo e clara de ovo e folículos ovulatórios reunidos obtidos do experimento 2 foram fracionados, diluídos e armazenados a -20°C .

2.6 Avaliação de método de biossensor SPR

2.6.1 Sensibilidade e especificidade analíticas

Para estabelecer o limite de detecção do ensaio, oito diluições
 seriais de 1:2 (v/v) de uma amostra de gema de ovo elevadamente imuno-
 responsiva e uma amostra de controle negativo de SPF foram analisadas em
 triplicata pelo biossensor SPR. Análise de variância (ANOVA) foi realizada
 usando SPSS (SPSS for Windows, Standard Version, 1999) para avaliar
 diferenças em respostas de biossensor SPR obtidas após injeção das amostras
 de controle serialmente diluídas. Soros de referência foram usados para injetar
 uma gema SPF para testar a especificidade do ensaio de biossensor SPR. Para
 este propósito, gema de ovo foi injetada com anti-soros reativos a 1) *S.*
enteritidis (sorogrupos D), 2) *S. infantis* (sorogrupos C), 3) *S. pullorum*
 (sorogrupos D), e 4) *S. typhimurium* (sorogrupos B). Estas amostras foram
 diluídas em seus volumes quer em uma proporção de 1:100 (1, 2 e 3) quer em
 1:50 (4). Teste de especificidade adicional foi realizado por injeção de gema
 de ovo SPF com anticorpo monoclonal de camundongo diluído 1:100 (v/v)
 reativo contra sorogrupos B, G, D e E de *Salmonella*.

2.6.2 Repetibilidade

A repetibilidade do ensaio de biossensor SPR foi avaliada pela
 corrida de amostra de gema de ovo elevadamente imuno-responsiva e de
 amostra de gema de ovo de controle negativo SPF duas vezes em um único
 dia e em três dias consecutivos (em triplo). Valores de médias, de desvios
 padrão (SD) e de coeficiente percentual de variação (%CV) foram calculados
 em Excel 2000 (pacote de programas de computador da Microsoft).

2.6.3 Curvas ROC

Curvas características de operador receptor (ROC) foram
 geradas usando os resultados das análises de biossensor SPR e de ELISA para
 avaliar os desempenhos de teste de cada ensaio (Zweig e Campbell, 1993).
 Usando SPSS, a acurácia total de cada ensaio foi calculada da área integrada

sob a curva (AUC), correspondendo ao erro padrão (SE) e à probabilidade da hipótese nula da AUC verdadeira sendo 0,5. Pelo uso de análise de ROC não-paramétrica (Metz et al., 1998), a acurácia de detecção por biossensor SPR de anticorpos contra S.e. foi comparada com a acurácia de dois ELISA's. O padrão ouro foi o estado de infecção do grupo experimental.

2.6.4 Especificidade e sensibilidade diagnósticas

Em uma curva ROC a taxa positiva verdadeira (sensibilidade) é plotada em função da taxa positiva falsa (especificidade-100) para pontos de corte diferentes de um parâmetro. Cada ponto sobre a curva ROC representa um par de sensibilidade / especificidade correspondendo a um limite de decisão particular. Assim, as sensibilidades diagnósticas máximas na especificidade diagnóstica mais alta para o ensaio de biossensor SPR e os dois ELISA's foram calculadas, usando SPSS. Para o teste de biossensor SPR usando as amostras do experimento 1, a especificidade diagnóstica máxima na sensibilidade diagnóstica mais alta e as especificidade e sensibilidade diagnósticas ótimas também foram calculadas.

3. Resultados

3.1 Especificidade e sensibilidade analíticas

Uma diluição de 1:640 (v/v) da amostra de gema de ovo elevadamente imuno-responsiva foi, em 50 RU, a diluição mais alta testada que diferiu significativamente ($P < 0,001$) do controle negativo.

Os sinais de teste das gemas de ovo SPF injetadas com soros positivos a *S. enteritidis* (1:100, 145 RU), *S. pullorum* (1:100, 1012 RU) ou *S. typhimurium* (1:50, 58 RU) positive estiveram acima do valor de corte de 52 RU (cf. seção 3.4.1 abaixo) e foram considerados positivos, como o foi a gema de ovo SPF injetada com anti-soro de camundongo anti-grupo D de *Salmonella* (1:100, 130 RU). Gema de ovo SPF não injetada foi verificada negativa, i.e. resposta média foi 30 RU. As gemas injetadas com soro positivo para *S. infantis* (1:100, 24 RU) e anti-soro de camundongo contra subgrupos

B (1:100, 27 RU), C (1:100, 16 RU), e E (1:100, 15 RU) de *Salmonella* também estiveram abaixo do valor de corte.

3.2 Repetibilidade

O coeficiente de variação dentro de um único dia foi 1% para a amostra de gema de ovo elevadamente imuno-responsiva e 13% para a amostra negativa. O coeficiente de variação de dia - para - dia durante três dias foi 2 % para a amostra positiva e 17% para a amostra negativa.

3.3 Determinação de limite

3.3.1 Análise de ROC

Análise de ROC foi realizada sobre os resultados de ensaio de 71 e 135 amostras de gema de ovo das galinhas não infectadas e infectadas, respectivamente, do experimento 1 (nem todos os testes foram realizados sobre 12 amostras das galinhas infectadas). Áreas integradas sob as curvas ROC foram 0,892 (SE 0,024, $P < 0,001$) para o ensaio de biossensor SPR; 0,432 (SE 0,039, $P = 0,103$) para o IDEXX ELISA e 0,430 (SE 0,039, $P = 0,096$) para o Guildhay ELISA (Tabela 31). As curvas ROC são mostradas na Fig. 4. A área integrada (AUC), e portanto a acurácia total, para o ensaio de biossensor SPR foi significativamente maior do que aquelas de IDEXX ($Z = 11,5$, $P < 0,001$) e Guildhay ELISA ($Z = 10,5$, $P < 0,001$).

Análise de ROC também foi realizada para quatro amostras de gema e clara de ovo combinadas e 15 amostras de gema de ovo de oito amostras de gema e clara de ovo combinadas, de galinhas não infectadas, e de oito amostras de gema de ovo de galinhas infectadas do experimento 2. As áreas integradas sob as curvas ROC foram 0,811 (SE 0,082, $P = 0,002$) para o ensaio de biossensor SPR, 0,615 (SE 0,098, $P = 0,098$) para o IDEXX ELISA e 0,870 (SE 0,064, $P < 0,001$) para o Guildhay ELISA (Tabela 32 e Fig. 5). A AUC do ensaio de biossensor SPR foi significativamente ($Z = 1,9$, $P = 0,055$) maior do que aquela de IDEXX ELISA, mas não diferente do que aquela de Guildhay ELISA ($Z = -1,0$, $P = 0,322$).

3.4 Estimativas de desempenho

3.4.1 Estimativas de especificidade e de sensibilidade diagnósticas

Com respeito aos resultados das amostras adquiridas do Experimento 1, as amostras da população não infectada deram respostas de biossensor variando de 6 a 50 RU. As respostas das amostras da população infectada variaram de 11 a 3584 RU. Em um valor de corte de 52 RU, 24 de 135 amostras tiveram que ser consideradas imuno-negativas.

Um valor de corte de 52 RU deu a estimativa de especificidade diagnóstica mais alta possível de 100 % (com um intervalo de confiança (CI) exato a 95% de 95-100 %) e uma estimativa de sensibilidade diagnóstica de 82 % (CI a 95%: 76-98 %) para o teste de ensaio de biossensor SPR. Um valor de corte de 10 RU deu a estimativa de especificidade diagnóstica mais alta possível de 100 % (CI exato a 95 %: 97-100 %) e uma estimativa de especificidade de 1 % (CI a 95%: 0-4 %). Um valor de corte de 42 RU deu as especificidade e sensibilidade diagnósticas combinadas ótimas: 84 % (CI a 95%: 77- 90 %) e 99 % (CI a 95%: 96-100 %), respectivamente.

Em um valor de corte de OD_{550nm} de 0,11, o IDEXX ELISA teve uma especificidade diagnóstica de 100 % e uma sensibilidade de 1 % (CI a 95%: 0-3 %). A OD_{550nm} das amostras da população não infectada variou de 0,174 a 1,377, i.e. acima do valor de corte a 0,11. Da população positiva, 145 de 147 amostras tiveram que ser consideradas imuno-negativas no valor de corte escolhido, a saber a OD_{550nm} correspondente variou de 0,042 a 1,572. O Guildhay ELISA teve uma especificidade diagnóstica de 100 % e uma sensibilidade de 16 % (CI a 95%: 10-22 %) em um valor de corte de OD_{650nm} de 0,12. Nenhuma das amostras da população não infectada mostrou valores de OD_{650nm} acima de 0,12 (0,051 a 0,093). No caso da população positiva, 124 de 147 amostras tiveram que ser consideradas imuno-negativas. A OD_{650nm} destas amostras variou de 0,048 a 1,471. No caso do Experimento 2, um valor de corte de 542 RU deu a estimativa de especificidade diagnóstica mais alta

possível de 100 % (CI exato a 95%: 82-100 %) e uma estimativa de sensibilidade diagnóstica de 63 % (CI a 95%: 39-86 %) para o teste de ensaio de biossensor SPR. As amostras da população não infectada tiveram valores de RU variando de 101-448. Os valores de população infectada variaram de 117- 3012 e 6 de 16 amostras tiveram resultados de teste negativos. Em um valor de corte de OD_{550nm} de 0,49, o IDEXX ELISA teve uma especificidade diagnóstica de 100 % e uma sensibilidade de 19 % (CI a 95%: 0-38 %). Nenhuma das amostras da população não infectada teve valores de OD_{650nm} menores do que 0,49. Os valores variaram de 0,537- 1,621. Da população positiva, 13 de 16 amostras tiveram resultados negativos no valor de corte escolhido. Os valores variaram de 0,134-1,630. O Guildhay ELISA teve uma especificidade diagnóstica de 100 % e uma sensibilidade de 67 % (CI a 95%: 43-91 %) em um valor de corte de OD_{650nm} de 0,14. Nenhuma das amostras da população não infectada teve valores de OD_{650nm} maiores do que 0,14. Os valores variaram de 0,072-0,140. Da população positiva, 5 de 15 amostras tiveram resultados de teste negativos (uma amostra não pôde ser testada). Os valores variaram de 0,086-2,144.

4. Discussão

O objetivo deste estudo foi quantificar as características de teste do biossensor SPR para a detecção de anticorpos de S.e. em ovos. Os resultados mostraram que o ensaio de biossensor SPR apresentou desempenho significativamente melhor do que aquele dos dois ELISA's comercialmente disponíveis para as amostras do Experimento 1. As especificidade e sensibilidade diagnósticas ótimas combinadas do biossensor SPR foram 84 % (77-90 %) e 99 % (96-100 %), respectivamente. Tanto o IDEXX ELISA baseado em *g,m flagellin*, quanto o Guildhay ELISA baseado em LPS não foram capazes de detectar a infecção de S.e. com uma especificidade e sensibilidade diagnóstica combinada mais alta usando este painel de teste. Este estudo indica que um ensaio de biossensor SPR poderia ser uma

ferramenta nova e poderosa para a monitoração de infecções causadas por *Salmonella enterica* sorovar *enteritidis* em rebanhos de galinhas poedeiras por meio de detecção de anticorpo em ovos.

O ensaio de biossensor SPR oferece a possibilidade de detectar infecções em uma maneira rápida e confiável. A qualidade alta do teste e as vantagens de bem-estar de animal e técnicas da coleção de ovos são boas razões para explorar seu uso em seleção de populações. Em adição, as configurações do biossensor SPR aplicado da Biacore permitem a detecção simultânea de anticorpos em múltiplos sorovares de *Salmonella* em uma única corrida em um único canal de sensor ou em canais de sensor separados sobre o mesmo chip sensor (resultados não mostrados). Isto poderia ser de significância porque é bem sabido que sorovares diferem em países no decorrer do tempo (veja por exemplo Refs. Guerin et al., 2005; van Duijnkere et al, 2002).

A avaliação de teste foi realizada usando ovos de dois experimentos que não foram realizados especificamente para esta avaliação de teste, possivelmente influenciando o desempenho do teste. Os ovos ‘positivos’ foram coletados provavelmente no instante de tempo que a resposta humoral estava se desenvolvendo nas galinhas expostas. Estes ovos ‘prematureos’ foram analisados e seus resultados falso-negativos interferem com a avaliação dos ensaios. Se pudesse ter sido possível excluir ovos até 2 semanas após a infecção, a sensibilidade diagnóstica de cada teste, ELISA ou biossensor SPR, teria sido melhorada.

Detecção de anticorpo em soro é mais sensível do que em ovos, porque o surgimento de anticorpos em ovos é precedido pelo surgimento em soro em uma semana (Gast e Beard, 1991; Sunwoo et al., 1996; Skov et al., 2002). Contudo, sensibilidade de rebanho aos testes para anticorpos em ovos pode ser melhorada pela aquisição de mais amostras, que é mais fácil do que quando se usam ovos. O desempenho do biossensor (AUC

0,892) foi comparado com aquele dos dois ELISA's comerciais, (IDEXX AUC 0,432, Guildhay AUC 0,430). Em nosso conhecimento IDEXX ELISA não foi validado para ovos, mas existem dados quantitativos sobre o desempenho de teste em comparação com outros testes: Van Zijderveld et al. (1992) avaliaram quatro ELISA's diferentes para diagnose de infecções por S.e. em galinhas experimentalmente infectadas. Relataram uma especificidade de 100% e uma sensibilidade de 95% para 127 gemas de ovos dos ovos postos entre 13 e 40 dias após a infecção com S.e. Em nossa avaliação, o teste de IDEXX não teve desempenho tão bom quanto na avaliação de 1992. Uma explicação poderia ser a seleção de amostra diferente, porque nossas amostras originaram-se dos experimentos de infecção que pararam 2 e 4 semanas após inoculação, tendo tido tempo para desenvolver uma resposta humoral.

É sabido que antígenos O compartilhados dentre os membros de sorogrupos B e D de *Salmonella* limitam a especificidade de detecção de S.e. usando antígenos de lipopolissacarídeo (de Vries et al., 1998; Baay e Huis in't Veld, 1993; Hassan et al., 1990). Isto é confirmado por nossos resultados: o ensaio não pôde diferenciar entre infecções com sorovares *enteritidis*, *gallinarum* e *typhimurium*, compartilhando O 9 e O 12. Visto que sorovares zoonóticos dos três (*S. typhimurium* mais *S. enteritidis*) representam 80% de isolados identificados pelos laboratórios de referência nacionais participando na rede de vigilância Enter-net entre 1998-2003 (Fischer et al., 2004), esta descoberta tem limitado a relevância clínica para a população humana. O ensaio diferenciou entre gema de ovo SPF injetada com anti-soro de camundongo anti-grupo B (1:100, 27 RU) e anti-grupo D (1:100, 130 RU) de *Salmonella*. Isto não é surpreendente, porque o LPS de *Salmonella enteritidis* possui O 1, O 9 e O 12 como antígenos somáticos, enquanto que os reagentes de teste específicos para grupo contêm os seguintes anticorpos monoclonais; anti-grupo B de *Salmonella*: Anti-O4, O 5, 027; anti- grupo D de *Salmonella*: Anti-O9.

O valor de corte de Experimento 2 foi muito maior do que o corte do Experimento 1, possivelmente porque parte de nossas amostras consistiu de gema e clara de ovo em vez de apenas gema de ovo. Para aplicações diferentes, valores de corte diferentes podem ser opcionais. Para aplicações diferentes, valores de corte diferentes podem ser ótimos. Custos relativos ou indesejabilidade de erros (classificações de positivo falso / negativo falso) e as proporções relativas esperadas de galinhas infectadas e não infectadas são parâmetros, importantes na determinação do valor de corte, que afeta o valor diagnóstico do ensaio. Sugeriríamos um valor de corte que minimize o número de resultados positivos falsos, raciocinando que amostragem e teste freqüentes seriam necessários se o ensaio fosse para ser usado em um programa de vigilância na população de galinhas poedeiras, dada a prevalência relativamente baixa de S.e.

A técnica de biossensor SPR tem detectada com sucesso anticorpos de ovo para determinar infecções experimentais em galinhas. Em programas de seleção futuros, o biossensor SPR poderia possivelmente detectar, ao mesmo tempo, analitos diferentes.

Tabela 31. Análise de ROC dos resultados das amostras derivadas do Experimento 1 analisadas por biossensor SPR, IDEXX e Guildhay ELISA's.

Característica	Ensaio de biossensor SPR	IDEXX ELISA	Guildhay ELISA
Corte otimizado	52 RU	OD _{550nm} 0,11	OD _{650nm} 0,12
Sensibilidade diagnóstica (%)	82	1	16
CI a 95% (%)	76-89	0-3	10-22
Especificidade diagnóstica (%)	100	100	100
CI a 95% ^a	95-100	95-100	95-100
AUC	0,892	0,432	0,430
CI a 95%	0,844-0,939	0,356-0,508	0,355-0,506

^a teste exato de Fisher

Tabela 32. Análise de ROC dos resultados das amostras derivadas do Experimento 2 analisadas por biossensor SPR, IDEXX e Guildhay ELISA's.

Característica	Ensaio de biossensor SPR	IDEXX ELISA	Guildhay ELISA
Corte otimizado	542 RU	OD _{550nm} 0,49	OD _{650nm} 0,14
Sensibilidade diagnóstica (%)	63	19	67
CI a 95% (%)	39-86	0-38	43-91
Especificidade diagnóstica (%)	100	100	100
CI a 95% ^a	82-100	82-100	82-100
AUC	0,811	0,615	0,870
CI a 95%	0,649-0,972	0,424-0,806	0,745-0,996

^a teste exato de Fisher

Exemplo 3

Introdução

Detecção direta de Campylobacter spp. por meio de monitoração de
infecções por bacteriófago usando glóbulos revestidos com LPS

Campylobacter é o patógeno mais comum proveniente de alimento em países desenvolvidos, causador de gastroenterite caracterizada por diarreia sanguinolenta e/ou aquosa. *Campylobacter* está associado com síndromes de Guillain- Barre (GBS), de Reiter e urêmica hemolítica (HUS) e artrite reativa (FSAI, 2002; Lake et al., 2003; Tauxe, 2000). Nos últimos 20 anos, a taxa de infecção de *Campylobacter* ainda está crescendo em muitos países desenvolvidos, talvez devido às melhorias em detecção e relatório. Nos Estados Unidos da América, 2.400.000 casos de campilobacteriose são relatados anualmente correspondendo a aproximadamente 1% da população dos E.U.A. (Tauxe, 2000).

Pássaros selvagens e animais domésticos são reservatórios de *Campylobacter* e disseminam bactérias no ambiente. Ave doméstica é um veículo importante para infecção por *Campylobacter* em humanos. De fato, cepas, que foram isoladas de galinhas, também puderam ser isoladas de pacientes (Coker, 2000). Estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo e o manuseio de carne de ave doméstica devem ser considerados como um risco maior para infecção de humano com *C. jejuni* ou *C. coli*

(FSAI, 2002). O fator de risco mais consistente nos Estados Unidos, Nova Zelândia e Europa tem sido o consumo ou o contato com carne de ave doméstica crua ou não cozida, totalizando 10% a 50% de todos os casos de campilobacteriose (Tauxe, 2000). *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* representam cerca de 90% de campilobacteriose de humano (Stern e Line, 2000). A dose efetiva de *Campylobacter* é considerada baixa, variando de 500 - 10.000 células (FSAI, 2002).

Campylobacter são bacilos Gram-negativos, curvos, de formato de S, ou de formato espiral possuindo um ou mais flagelos em um dos pólos e são elevadamente móveis (Ghristensen et al., 2001). *Campylobacter* cresce entre 30,5°C e 45°C em uma temperatura ótima de 42°C. Crescimento ótimo é estabelecido em 10% de dióxido de carbono, 5-6% de oxigênio, e 85% de nitrogênio (FSAI, 2002).

Métodos de fenotipificação tradicionais para determinação de *Campylobacter* demoram de 4 a 5 dias e envolvem pré-enriquecimento seguido por isolamento de ágar seletivo e confirmação por teste bioquímico. Devido à natureza perecível de itens de alimento e a velocidade requerida para análise de produtos de alimento, são necessários métodos mais rápidos, sensíveis e específicos para detecção custo-efetiva de *Campylobacter*.

Procedimentos de separação imunomagnética (IMS) foram usados por Waller e Ogata (2000), Che et al. (2001), Yu et al. (2001) para concentrar *C. jejuni* de carne de ave doméstica sem a etapa de cultura celular de pré-enriquecimento. Esta abordagem pôde recuperar 10^4 unidades formadoras de colônia (cfu)/g em carnes de ave doméstica conforme detectadas com microscopia de fluorescência e força atômica (Yu et al., 2001). IMS pode potencialmente reduzir o tempo de pré-enriquecimento de *Campylobacter* e pode suplantar os problemas de inibidores de fontes de alimento tais como inibidores de PCR (Benoit e Donahue, 2003). O uso de IMS pode portanto acelerar o enriquecimento do analito.

Este exemplo descreve um método de detecção a jusante usando bacteriófagos específicos para *Campylobacter*, i.e. organismos virais pequenos que se fixam em ou infectam bactérias vivas *Campylobacter*. Sua fixação ou infecção é dependente da fase do ciclo devida da bactéria. Ligação em ou infecção de *Campylobacter* pode ocorrer a saber em fase estacionária, log ou lag da bactéria e também depende da espécie de fago. Infecção da bactéria resulta normalmente em um número alto de cópias de bacteriófago. Registro deste aumento de fagos é portanto usado como um instrumento analítico para traçar a presença de *Campylobacter* na amostra original.

O objetivo deste estudo é demonstrar que a aplicação de bacteriófagos como ferramentas analíticas específicas e sensíveis para a detecção de *Campylobacter* em produtos animais, tais como fezes e carnes (de aves domésticas).

Materiais e métodos

Configuração experimental

Após homogeneização, e.g. facilitada por digestão, IMS será usada para purificar e concentrar *Campylobacter* de amostras contaminadas, tais como carne e fezes. Na segunda etapa, bactérias isoladas por IMS serão incubadas com, uma cepa apropriada de bacteriófago. Bacteriófagos não-fixados serão removidos por lavagem do isolado celular usando o mesmo procedimento de IMS. *Campylobacter* imobilizado por IMS trazendo bacteriófago e/ou infectado são então introduzidos em uma cultura fresca e pura de *Campylobacter* de referência que está em uma fase estacionária. Esta cultura de células é usada como um hospedeiro estranho para reforçar a multiplicação dos bacteriófagos. Após uma cultura curta para permitir que as bactérias alcancem sua fase log, os bacteriófagos serão colhidos por centrifugação. O sobrenadante contendo bacteriófago será incubado com glóbulos fluorescentes revestidos com LPS. Aqui, o glóbulo está revestido como descrito no exemplo com o LPS isolado de *Campylobacter* usado como

o organismo hospedeiro. A presença de bacteriófagos ligados nos glóbulos fluorescentes será testada em duas maneiras. Após a adição de e incubação com anticorpos anti-bacteriófago marcados com um marcador fluorescente, a quantidade de fluorescência corresponderá à concentração de bacteriófagos e indiretamente à concentração de *Campylobacter* na amostra original. Em uma abordagem alternativa, anticorpos anti-LPS contendo um marcador fluorescente competirão com bacteriófagos pelos lugares de ligação. Uma diminuição da fluorescência registrada em comparação com uma amostra livre de *Campylobacter* indicará, portanto, uma amostra positiva para *Campylobacter*. O teste será validado em termos de seletividade e de sensibilidade por *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* em matrizes diferentes, incluindo fezes, pele, e carne de porcos e galinhas. Organismos proximamente relacionados, tais como espécies *Arcobacter*, serão usados para testar a especificidade do método.

15 *Cepas virais e bacterianas e condição de cultura*

C. jejuni (ATCC 33291) e *C. coli* (ATCC 33559) serão adquiridas de Microbiologies (St. Cloud, USA). As bactérias crescerão em caldo de soja-triptona (TSB) (Oxoid, CM 129, Hampshire, Inglaterra) por 24 h a 42°C, sob atmosfera microaerofílica, que será gerada usando um cilindro de gás (BBL, Becton Dickinson, Sparks, USA). *Campylobacter* são então posicionadas sobre Ágar de Carvão-Cefoperazona-Desoxicolato (mCGDA) (base de ágar seletiva livre de sangue com *Campylobacter* [Oxoid, CM 739] com suplemento seletivo CCDA [Oxoid, SR155], cefoperazona 32 µg/mL e anfotericina B 10 µg/mL) e incubados sob atmosfera microaerofílica por 24 h a 48 h a 42°C. Uma colônia pura de *Campylobacter* é então transferida para o ágar de soja tríptica (TSA) (Oxoid, CM131) e será incubada sob uma atmosfera microaerofílica por 24 h a 48 h a 42°C e então deixada em um refrigerador a 4°C até o uso. Bacteriófagos infectantes de *Campylobacter* NTCC12669, NTCC12670, NTCC12671, NTCC12672, NTCC12673,

NTCC12674, NTCC12675, NTCC12676, NTCC12677, NTGC12678, NTCC12679, NTCC12680, NTCC12681, NTCC12682, NTCC12683, NTCC12684 são adquiridos da National Type Culture Collection (Londres, Reino Unido).

5 *Preparação de amostra*

A cultura de *Campylobacter* pura armazenada a 4°C será subcultivada em TSB e incubada sob atmosfera microaerofílica por 24 h a 42°C. Este é o hospedeiro para crescimento exponencial do bacteriófago.

10 Uma quantidade de 25 g de filé de galinha moído será suspensa em 225 mL de caldo de Preston (Caldo Nutriente de No.2 [Oxoid, CM 67], 5% (v/v) de sangue lisado de cavalo [Oxoid, SR48], suplemento para crescimento de *Campylobacter* [Oxoid, SR232] e suplemento sepetivo para *Campylobacter* de Preston modificado [Oxoid, SR204]) contido em um saco digestor. O meio de caldo de Preston será preparado de acordo com a
15 instrução do fabricante. O saco digestor contendo amostra será homogeneizado por 90 s em um digestor (Inter science, St.Nom, França). A suspensão inteira será então incubada sob atmosfera microaerofílica a 42°C por um tempo de incubação apropriado para permitir o crescimento de *Campylobacter*.

20 *Separação imuno-magnética*

Após enriquecimento com caldo de Preston, o saco digestor contendo a amostra será adicionado em um pote de incubação da máquina de IMS (Pathatrix™, Microscience, Cambridgeshire, UK). A aparelhagem é então operada de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 50
25 µL de glóbulos magnéticos anti-*Campylobacter* (Microscience) serão adicionados na amostra, que é então recirculada 30 min a 37°C. Os glóbulos magneticamente imobilizados são liberados, lavados com 100 mL de água de peptona tamponada preaquecida (peptona [Becton Dickinson] 10 mg/mL, cloreto de sódio [Merck, Darmstadt, Alemanha] 5 mg/mL, hidrogeno-fosfato

de dissódio di-hidratado [Merck] 4,5 mg/mL, diidrogeno-fosfato de potássio [Merck] 1,5 mg/mL ajustado para pH 7,2) e então atraídos de novo pelo magneto. Solução de lavagem foi removida deixando uma suspensão de 200 µL para crescimento seletivo e análises de bacteriófago.

5 *Detecção de bacteriófagos*

Glóbulos-IMS trazendo *Campylobacter* são contatados com um volume pequeno de bacteriófagos específicos para bactéria. Após uma incubação curta para permitir fixação específica dos fagos na superfície da bactéria alvo, os glóbulos de IMS são lavados e amostrados para ajustar um
10 ponto de referência no procedimento de análise final. O restante da suspensão é misturado com uma suspensão de espécie *Campylobacter* fresca para hospedar o bacteriófago em crescimento. Após incubação a 42°C, a suspensão é centrifugada e o sobrenadante será suplementado com um volume de glóbulos fluorescentes revestidos com LPS de *Campylobacter*. Multiplicação
15 de fagos é então avaliada após a adição quer de anticorpos fluorescentemente marcados anti-bacteriófago quer anticorpos fluorescentemente marcados anti-*Campylobacter*. Após uma incubação de 15 min, os glóbulos são analisados usando e.g. um dispositivo BioPlex (Bio-Rad) para selecionar fluorescência imobilizada sobre os glóbulos como um resultado de reações de ligação
20 específicas.

Exemplo 4

Introdução

Detecção de anticorpos anti- Salmonella em soro porcino e suco de carne de galinhas usando glóbulos fluorescentes

25 Microorganismos incluem uma ampla variedade de bactérias, bolores (fungos), parasitas e vírus. Microorganismos patogênicos têm atraído muito mais atenção do público como consumidores de água e alimento contaminados, que resultaram em ataques de família ou de comunidade. Como uma consequência, a mídia e os políticos têm desempenhado sua parte

no aumento da conscientização do consumidor e legislação nova está em preparação ou já em uso.

Com respeito aos microorganismos patogênicos, atenção especial é dada a numerosas doenças zoonóticas, i.e. micróbios transmissíveis de animais para humano, pelas seguintes razões: 1) a maioria das doenças provenientes da água e de alimento são de natureza zoonótica; 2) muitos agentes zoonóticos possuem sua rota de transmissão através do ambiente, e 3) contaminações tanto de alimento / água quanto do ambiente também são usadas por (bio)terroristas para adquirirem o impacto máximo na sociedade.

Perigos microbiológicos podem entrar nas cadeias alimentares em qualquer ponto durante pré-colheita, produção, processamento, transporte, venda a varejo, armazenagem doméstica ou preparação de refeição. A partir de sua introdução em ração ou alimento, podem ocorrer ambientes elevadamente complexos nos quais o microorganismo pode esquivar-se da detecção e inativação. Sistemas de distribuição internacional eficiente e mudanças rápidas nas preferências dos consumidores podem facilitar a penetração rápida de patógenos através de populações grandes, encurtando sobremaneira o tempo de reação disponível para agências de saúde pública.

Autoridades e produtores de alimentos estão convencidos de que ensaios mais rápidos, versáteis e seletivos (diagnósticos) são necessários para monitoração ambiental, de ração e de alimento para reagir adequadamente às ligações contaminadas na cadeia alimentar.

Uma grande porção das técnicas de monitoração exploradas envolviam o uso de tecnologias de ensaio de afinidade, incluindo plataforma de biossensor.

Em [AAB5] princípio, detecção da presença de microorganismos pode ser realizada em duas maneiras: direta ou indiretamente. No ensaio direto, o próprio organismo é detectado normalmente com a aplicação de anticorpos reagindo com estruturas

antigênicas específicas para cepa e/ou (sub)espécie. Esta análise imunoquímica segue a preparação de amostra consumidora de tempo por meio de cultura em meios de crescimento seletivos. No caso de infecção de parasita, isto não é possível e detecção direta envolve inspeção microscópica de amostras. No ensaio indireto, a presença do microorganismo é sugerida pela detecção de produtos humorais (imunoglobulinas) ou celulares (e.g., citocinas) de uma resposta imunológica do hospedeiro infectado. Na maioria dos estudos, antígenos bem definidos são usados para capturar imunoglobulinas de hospedeiro em qualquer fluido corporal (sorologia). A ligação observada então revela a natureza de uma infestação invasiva de um patógeno.

As vantagens e desvantagens de detecções de patógeno indireta e direta são claras: i) indivíduos não são sempre imunologicamente responsivos a uma infecção, i.e., diferenças entre respondedores imunes baixos ou altos, ii) respostas humorais são retardadas vários dias ou até mesmo semanas possivelmente deixando uma infecção recente não notada, iii) anticorpos de soro podem ser encontrados onde o organismo causador não é detectado, porque ele mesmo tem sido rejeitado ou retraído em certos tecidos (não amostrados), iv) investigações sorológicas são muito rápidas e muitas vezes oferecem possibilidades melhores para rendimento alto do que a detecção direta, e v) análise sorológica de soro ou plasma prediz o estado de infecção de *Salmonella* de um rebanho ou bando melhor do que análise direta de antígeno, i.e. cultura bacteriana seletiva clássica.

De fato, sorologia realizada melhor detecção direta, e na maioria dos casos insensível de parasitas de tecido, que pode ser apenas realizada por histoquímica ou técnicas de digestão e microscopia. Diferenças significativas também são evidentes em coleta e preparação de amostra: enquanto que bactérias, fungos e vírus têm que ser cultivados de matrizes para facilitar sua detecção em soluções enriquecidas, sangue é relativamente

facilmente coletado e preparado para análise. Aqui, deve ser observado, contudo, que anticorpos não podem ser apenas recuperados de sangue, plasma ou soro, mas também de músculo (suco de carne), leite, colostros, fluido cerebroespinal e ovos. Em particular, amostragem de ovos, de suco de carne e/ou de leite é mais fácil e mais custo-efetiva do que a amostragem de sangue, plasma, soro ou fluido cerebroespinal.

Métodos diagnósticos baseados em análise sorológica de materiais biológicos contendo anticorpo são portanto aprovativos em denominada matança de animais. Nesta abordagem de processamento inovadora, decisões baseadas em evidência e confiáveis são feitas baseando-se em monitoração contínua e intensiva em nível de fazenda de se a animais são permitidos entrarem em uma infra-estrutura de processamento contaminada com *Salmonella* ou livre de *Salmonella*.

Dentre os componentes da estrutura antigênica do gênero *Salmonella*, os antígenos somáticos são importantes como um instrumento para traçar resposta imune em animais sob uma infecção invasiva deste organismo. Antígenos somáticos estão localizados sobre a parte de polissacarídeo de lipopolissacarídeo (LPS), que é um constituinte da parede celular bacteriana. Detecção de uma resposta humoral com escolha cuidadosa de LPS, pode ser deduzida a identidade do sorogrupo de *Salmonella* infectante.

Em Dinamarca, Alemanha, Grécia e Os Países-Baixos, 39.5% de todos os porcos positivos para *Salmonella* amostrados no abatedouro foram determinados como *S. typhimurium*. Dependente do país, outros isolados importantes de porcos foram *S. derby* (17,1%), *S. infantis* (8,0%), *S. panama* (5,1%), *S. ohio* (4,9%), *S. london* (4,4%), *S. livingstone* (3,1%), *S. virchow* (2,7%), *S. bredeny* (2,1%), *S. mbandaka* (1,1%), *S. Brandenburg* (1,0%), *S. goldcoast* (0,8%).

No caso de galinhas, 14% das galinhas foram positivas para

Salmonella em nível de rebanho em 2002 em Os Países-Baixos. O sorovar predominante foi naquele caso *S. paratyphi B var. Java*.

O nível de venda varejo uma percentagem comparável (13,4%) foi encontrada em Os Países-Baixos. Os sorovares mais freqüentes de *Salmonella* isolados dos frangos em 14 estados membros de EU foram *S. paratyphi B var. Java* (24,7%), *S. enteritidis* (13,6%), *S. infantis* (8,0%), *S. virchow* (6,7%), *S. livingstone* (5,7%), *S. mbandaka* (5,5%), *S. typhimurium* (5,3%), *S. senftenberg* (5,0%), *S. fiadar* (3,7%). *S. paratyphi B var. Java* é dominante, mas é totalmente atribuível ao Os Países-Baixos.

Em suíno e galinhas produtores de alimento, os sorogrupos de *Salmonella* prevalecentemente ocorrentes são portanto pertencentes aos grupos B, C e D, e no caso de suíno também E.

Neste estudo, é explorada uma nova plataforma de ensaio de afinidade analítica para a detecção indireta de infecção de *Salmonella* em porcos e galinhas. Esta plataforma de tecnologia de Luminex analisa glóbulos internamente codificados que podem estar revestidos com antígenos diferentes em um teste único. Apenas quando fluorescências de ambos do glóbulo e do analito ligado passam no detector será registrada uma resposta. Esta abordagem é aplicada para detectar anticorpos anti-*Salmonella* em soro e líquido extraído (*drip*) de carne.

Materiais e métodos

Compostos químicos

Kit de copulação de amina, consistindo de N-hidróxi-succinimida (NHS), cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida (EDC) e cloridrato de etanol-amina - hidróxido de sódio de pH 8,5 foram adquiridos de Biacore AB (Uppsala, Suécia). Etanol e ácido tricloro-acético (TCA) foram adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemanha). Cianoboroidreto de sódio e carbohidrazida foram obtidos de Fluka Chemie GmbH (Buchs, Suíça). Hemoglobina (Hb) porcina foi adquirida de Sigma

Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.). Água foi obtida de um sistema de purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.).

Materiais

Colunas NAP-5 (0,5 mL; Sephadex G-25) foram adquiridas de Amersham Biosciences e foram usadas como descrito pelo produtor. Chips biossensores CM5 foram adquiridos de Biacore AB. Saco de diálise (Spectra/Por) com um corte de 1 kDa foi obtido de Spectrum Laboratories Inc. (Rancho Dominguez, CA, U.S.A.). Alexa532 foi de Molecular Probes (Leiden, Os Países-Baixos). IgG (H+L) de cabra anti-suíno foi pedida de Jackson Immunoresearch (West Grove, PA, USA). Este anticorpo foi conjugado com Alexa532 usando procedimentos de marcação padrão.

Anti-soros anti- Salmonella

Anti-soros monoclonais somáticos 'O' monovalentes de *Salmonella* contra O4, O5, O6₁, O7, O8, O9, O10 foram adquiridos de Sifin (Berlin, Alemanha). Soluções de anticorpo foram diluídas em PBS 50 mM para suas concentrações de trabalho.

Soros porcinos e de aves de referência

Todos os soros de referência foram obtidos do Dutch Animal Health Service (Deventer, Os Países-Baixos). O soros de referência de aves obtidos foram reativos com *Salmonella enteritidis* (sorogrupo D¹), *S. typhimurium* (sorogrupo B), *S. pullorum* / *gallinarum* (Spg; sorogrupo D₁) e *S. infantis* (sorogrupo C₁), e foram adicionalmente referidos como CH-Se, CH-St, CH-Spg e CH-Si, respectivamente. Estes soros de galinha foram originalmente preparados para análises ELISA como referências positivas. Em adição, soro de galinha livre de patógeno (adicionalmente referido como CH-SPF) foi obtido desta organização como amostra de referência de controle negativo. Estes soros foram reconstituição de material seco por congelamento pela adição de água em um volume indicado pelo produtor. Igualmente, soros porcinos de animais desafiados com *S. typhimurium* e *S. livingstone*

(sorogrupo C₁) foram adquiridos de GD e foram referidos como P-St e P-Sl, respectivamente. Em adição, soro porcino reativo a sorotipo-2 de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (GD) usado como controle em um Teste de Fixação de Complemento, foi explorado como controle negativo para soro porcino no ensaio de biossensor de *Salmonella*.

Métodos

Extração de LPS_[AAB6]

Culturas noturnas de *Salmonella* foram preparadas pela aplicação de 100 µL de seus estoques correspondentes sobre cada uma das 120 placas contendo ágar de infusão de coração (BHIa, Oxoid). As bactérias foram colhidas da superfície das placas para dentro de 1 mL de solução (salina) de NaCl 9 g/L por placa de ágar usando uma espátula trigalski. Cada placa foi lavada duas vezes com 2 mL de solução salina. Bactérias combinadas foram centrifugadas em seis tubos a 10.000 g e a 4°C por 15 min e o sobrenadante foi descartado. Esta etapa de centrifugação foi repetida duas vezes com 75 mL de solução salina de lavagem por tubo em cada corrida. Enquanto mantidas sobre gelo, as bactérias pelotizadas foram suspensas em água em uma razão volumar, que foi uma de 5 vezes em relação ao peso das bactérias. Um equivolume de TCA 0,250 M (Se) ou 0,500 M (Sg, Sl, Sm e St) foi adicionado para dar concentrações finais de 0,12 M e 0,25 M, respectivamente, seguido por agitação contínua a 4°C por 3 h. Um sobrenadante contendo lipopolissacarídeo (LPS) foi então adquirido a 20.000 g e 4°C por 30 min. O pH do sobrenadante foi ajustado para pH 6,5 com hidróxido de sódio 5 M e quando se aproximava de pH desejado com hidróxido de sódio 0,10 M. O volume final da solução contendo LPS foi determinado antes da armazenagem a -18°C por 30 min. A solução foi diluída com um volume duplo de etanol absoluto congelado de um lugar de armazenagem a -18°C, e incubação foi continuada durante a noite a -4°C sem agitação em um dispositivo fechado, construído em casa, com etileno-glicol /

água (1:4, v/v) frio circulando. Uma pelota contendo LPS foi obtida após centrifugação a 20.000 g e a -4°C por 30 min. O material particulado foi suspenso em um volume de 0,5 mL de água por grama de massa bacteriana original pesada no início do processo de extração. A suspensão foi dialisada em um saco de diálise de 1-kDa contra água a 4°C por dois dias com reposição de água intermitente regular. O conteúdo do saco foi centrifugado a 20.000 g e a 4°C por 30 min, e o sobrenadante foi liofilizado. O liofilizado foi pesado para estabelecer a recuperação de LPS. LPS foi reconstituído em água para compor uma concentração final de 5 mg/mL. Dependendo do tipo de LPS e do número da batelada, um volume de hemoglobina (Hb) porcina a 1 mg/mL foi adicionado em uma concentração como indicada no texto. Cada batelada foi dividida em porções em frações de 0,5 de LPS, que foram secas usando um evaporado a vácuo e então armazenadas a 5-8°C.

Oxidação de LPS_[AAB7]

Uma porção de 0,5 mg de LPS fortificado com hemoglobina foi dissolvida em 500 µL de acetato de sódio 100 mM de pH 5,5. Após a adição de 20 µL de periodato de sódio 50 mM (Sigma), a solução foi incubada por 40 min sobre gelo protegida da luz. A oxidação de LPS foi interrompida e a solução foi dessalinizada pela passagem de 500 µL da mistura reacional através de um cartucho NAP-5 com um fluxo controlado por gravidade. LPS modificado foi eluído com 1 mL de acetato de sódio 10 mM, pH 4,0. Antes do uso, o cartucho foi condicionado três vezes com 3 mL de acetato de sódio 10 mM, pH 4,0.

Imobilização de LPS_[AAB8]

Para imobilizar os antígenos de LPS oxidado nos glóbulos, os grupos ácido carboxílico na superfície do glóbulo foram ativados com uma mistura de EDC/NHS disponível do kit de copulação de amina por 20 min sobre um *gyro rocker*. Após centrifugação e remoção de sobrenadante, ativação foi seguida por uma reação com carbohidrazida aquosa 5 mM por 20

min. Glóbulos com superfície modificada foram pelotizados de novo e o líquido superior foi descartado antes da adição de etanol-amina 1 M e incubação por 20 min. Após outra etapa de centrifugação a 14.000 g por 5 min, LPS oxidado dissolvido em acetato de sódio de pH 4,0 foi adicionado para permitir imobilização por 90 min. Após remoção do sobrenadante adquirido por centrifugação, a ligação entre a superfície do glóbulo e o antígeno foi estabilizada usando cianoboroidreto de sódio 100 mM dissolvido em acetato de sódio 10 mM em pH 4.

Ensaio BioPlex

Após aquecimento do dispositivo de contagem de glóbulos, este BioPlex (BioRad, Veenendaal, Os Países-Baixos) foi calibrado de acordo com as instruções do produtor usando um kit de calibração de BioPlex (BioRad). Amostras foram diluídas em PBS 50 mM em cavidades de uma placa de microtítulo que foram então suplementadas com 50 µL de 5.000 glóbulos/mL de glóbulos revestidos de LPS. A ligação de antígeno-anticorpo foi permitida por 30 min sobre um agitador de placa de microtítulo operado a 200 rpm. Então 10 µL de IgG (H+L) de cabra anti-suíno marcada com marcadores fluorescentes Alexa532 diluídos 8 vezes em PBS 50 mM foram adicionados e incubação foi continuada por 15 min sobre o agitador. Os glóbulos foram então analisados para seus perfis de fluorescência por 30 s na máquina BioPlex.

Resultados e discussão

Glóbulos fluorescentes foram preparados para revestimento com LPS de fontes diferentes de sorovares de *Salmonella* específicos representado os sorogrupos B, C e D relevantes como zoonoses em alimentos de galinha e suíno. Deve ser observado que o sorogrupo E, que é relevante para produtos de carne de porco, não é aqui estudado. Após a imobilização de cada tipo de LPS em glóbulos individuais, que estão internamente codificados, o sucesso do revestimento foi avaliado usando anti-soros

monoclonais comercialmente disponíveis contra antígenos somáticos O4, O5, O7, O8 e O9. Contudo, embora anti-O5 desse uma resposta de 6398 unidades, anti-O9 deu 145 unidades, enquanto que o sinal de fundo de anticorpos-antígenos não combináveis foi menor do que 91 unidades em todos os casos (Fig. 6). Em uma maneira similar, anti-O4 e anti-O7 deram respostas de 305 unidades e 174 unidades, respectivamente (Fig. 7). Estas diferenças em respostas entre preparações de anti-soros comercialmente disponíveis estiveram em correspondência muito boa com aquelas observadas usando um biossensor de Ressonância de Plasmon de Superfície (SPR) e refletem diferenças em títulos de anticorpo.

Em um modo similar, as atividades de bateladas de LPS idênticas oxidadas em dias diferentes foram testadas usando um painel similar de anti-soros comerciais (Fig. 8). Comparado com outra batelada de oxidação, as respostas variaram entre 57% e 148%, que é suscetível de melhorias.

Preparações diferentes de líquido extraído (*drip*) de carne, i.e. suco que é adquirido de tecido muscular após um ciclo de congelamento e descongelamento, e soros de galinhas foram analisadas (Fig. 9). Atividades registradas foram como esperado. Soro, líquido extraído (*drip*) de carne, e uma mistura de soro e líquido extraído (*drip*) de carne de galinhas livres de *Salmonella* deram glóbulos conjugados fluorescentes abundantes baixos. Em contraste, anti-*S. pullorum* e anti-*S. gallinarum* devem dar uma resposta sobre sorogrupos B e D, porque contêm antígenos O1 e O12, que ocorre para líquido extraído (*drip*) e soro. *S. infantis* contém antígeno O6, que é compartilhado por C₁ e C₂. De fato, esta atividade é observada em líquido extraído (*drip*) e soro [AAB9].

Além de soro de galinha, soros suínos preparados também foram testados (Fig. 10). Soro de porcos livres de *Salmonella* deram respostas MFI dentro da faixa de 110 unidades (sorogrupo C₂) a 137 unidades (sorogrupo B) e estiveram próximas das respostas de glóbulos apenas

incubados com tampão, a saber 94 unidades (sorogrupo D) a 129 unidades (sorogrupo C₂). Como esperado, sinais significativos foram registrados quando soros foram injetados com anti-soros anti-*S. typhimurium* e *S. livingstone*, a saber 969 unidades sobre sorogrupo B e 207 unidades sobre sorogrupo C₁, respectivamente. Os soros injetados não reagiram com antígenos não-correspondentes entre 104 unidades MFI 131 unidades MFI.

Exemplo 5

Determinação de anticorpos anti-*Salmonella* em espécies exóticas de aves usando um biossensor SPR_[AAB10]

Objetivo do estudo

O objetivo deste estudo foi explorar se a tecnologia de biossensor SPR desenvolvida baseada no uso de LPS de *Salmonella* selecionado imobilizado para detectar indiretamente infecções de *Salmonella* em animais produtores de alimento, também é capaz de detectar tais infecções em espécies animais exóticas.

Materiais

Plasmas de tucanos (*Rhamphastos toco*) e de um galo silvestre (*Tympanuchus phasianellus*), que estavam infectados com *S. typhimurium* de diferentes tipos de fago, foram gentilmente proporcionados pelo dr. W. Schaffcenaar e pelo eng. M. de Boer (Veterinary Department, Rotterdam Zoo, Os Países-Baixos). A história de doença destes animais é a seguinte.

Das fezes de um tucano amostradas em 24 de março de 1994, fagotipo 292 de *S. typhimurium* foi isolado. De outra amostra de fezes de mesmo pássaro, fagotipo 352 de *S. typhimurium* 352 foi isolado em 28 de junho de 1994. Plasma de 24 de agosto de 1994 foi coletado deste animal usado para análise SPR neste estudo.

Sangue foi coletado de um galo silvestre doente em 28 de outubro de 1997. O plasma preparado deste sangue foi usado para análise neste estudo. Este animal morreu no dia seguinte. Fagotipo 507 de *S.*

typhimurium foi isolado da ave morta.

Métodos

Um biossensor SPR (Biacore 3000) contendo um chip sensor cujos canais de fluxo estavam revestidos com LPS de *S. enteritidis*, *S.*
 5 *livingstone*, *S. goldcoast* e *S. typhimurium*, foi operado como descrito no início. Amostras de plasma foram diluídas como descrito para os soros em Exemplos 1 e 2 e analisadas.

Resultados e discussão

A invenção foi em primeiro lugar desenvolvida para aplicação
 10 em cadeia alimentar para garantir a segurança de alimento de origem animal com respeito às contaminações de *Salmonella*. Contudo, o campo de aplicabilidade foi testado com plasma coletado de duas espécies exóticas, a saber um tucano (*R. toco*) e um galo silvestre (*T. phasianellus*), que foram infectadas com *S. typhimurium* como descrito pelos diagnósticos
 15 microbiológicos clássicos (comunização pessoal com M. de Boer, Blijdorp Zoo, Rotterdam). As fezes do tucano foram verificadas positivas cinco e dois meses antes da amostragem de sangue e uma resposta humoral pôde desenvolver no decorrer de um período de tempo relativamente longo. De fato, a resposta de biossensor foi alta (Tabela 33). Comparada com o soro
 20 branco de galinhas SPF e com anti-soro padrão (anti-sorogrupos A a S), a reatividade com LPS de *S. typhimurium* foi dramaticamente alta (4185 unidades de resposta (RU)). Uma resposta também foi observada no canal de *S. enteritidis* (1220 RU), que também foi observada para o soro de galinhas elevadamente infectadas exclusivamente com *S. typhimurium* e está de acordo
 25 com a presença de antígeno somático)12 em ambos os sorovares e portanto nos sorogrupos B e D (cf. Tabelas 1 e 3). Surpreendentemente, uma resposta relativamente alta também foi observada no canal de *S. goldgoast*. Não pode ser aqui excluído que esta ave foi infectada com múltiplos sorovares de *Salmonella* simultânea ou seqüencialmente com *S. typhimurium* como a

última infecção, incluindo uma infecção C₂.

O plasma do galo silvestre não foi muito reativo com os tipos de LPS diferentes, mas a reatividade foi em todos os casos maior do que aquela do soro branco e sobre LPS de SI e de St maior do que aquela do anti-soro de referência (Tabela 33). Visto que as aves morreram rapidamente desde a infecção, uma resposta humoral significativa contra os antígenos selecionados provavelmente não foi totalmente desenvolvida e não detectada pelo biossensor. Deve ser observado portanto que sorologia é não muito adequada para diagnose em um nível individual. Como evidenciado em Swanenburg (Utrecht Thesis, Utrecht University, 2000), sorologia é, em particular, adequada para avaliar o estado de *Salmonella* em um nível de população.

Tabela 33. Resultados da análise de plasma coletado de um tucano e de um galo silvestre que estavam infectados com *S. typhimurium*. Os resultados são expressados em unidades de resposta relativa. Amostras foram analisadas três vezes.

Canal de fluxo revestido com LPS de	Nível de imobilização de LPS de sondagem	Soro de galinhas SPF ^a	Anti-sorogrupo B ^b	Plasma de tucano	Plasma de galo silvestre
Se	3241	17 (3)	-3 (1)	1220 (304)	33 (1)
Sg	3354	9 (4)	-8 (1)	492 (186)	59 (9)
SI	5241	6 (6)	-29 (2)	58 (12)	89 (8)
St	2755	46 (6)	663 (33)	4185 (362)	73 (8)

^a soro de galinhas livres de patógeno específico, i.e. soro branco

^b anticorpo monoclonal comercialmente disponível reativo ao sorogrupo B de *Salmonella*.

Exemplo 6

Detecção de bacteriófago Felix O1 (FO1) por meio de sua ligação em LPS de Salmonella LPS imobilizado sobre superfície de chip biossensor SPR

Objetivo

Para determinar a ligação do bacteriófago FO1 em LPS

imobilizado na superfície de biossensor

Abordagem

Para provar a ligação de bacteriófago Felix O1 (FO1, Felix d'Herelle Reference Centre for Bacterial Viruses, Laval, Canadá) em LPS de *Salmonella*, o bacteriófago foi diluído em HBSEP para obter uma série de concentrações. Estas amostras foram injetadas por 2 min no biossensor para permitir ligação em LPS de *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. goldcoast* e *S. livingstone*, que foram cada um imobilizados separadamente em um canal de fluxo individual do chip sensor.

Resultados

Os resultados são sumariados na Fig. 11.

Embora uma concentração relativamente alta de bacteriófago fosse necessária para obter uma resposta significativa, é evidente deste experimento que 10^9 PFU de bacteriófagos FO1/mL e maior ligaram em LPS copulado nesta superfície de chip.

Exemplo 7

Deteção de bacteriófago FO1 por meio de sua ligação em LPS de S. typhimurium imobilizado sobre um biossensor SPR após sua incubação com S. typhimurium, S. enteritidis, S. goldcoast e S. livingstone

Objetivo

Para determinar a ligação de bacteriófago FO1 em uma cultura viva de *Salmonella* spp. em HBSEP.

Abordagem

Concentrações diferentes de culturas de *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. goldcoast*, *S. livingstone* e meio branco foram misturadas por 5 min com $1,2 \times 10^9$ PFU de bacteriófago FO1. Após incubação, as bactérias foram centrifugadas e o sobrenadante foi analisado em Biacore com um chip biossensor contendo LPS imobilizado de *S. typhimurium*.

Resultados

Com o objetivo de determinar respostas significativas, um valor de corte foi estabelecido pelas leituras tomadas na média de meio branco não contendo *Salmonella* mas contendo $1,2 \times 10^9$ PFU de bacteriófagos, menos 3 vezes desvio padrão. Aplicação deste valor foi descrito que *Salmonella* deve estar presente em uma concentração de pelo menos 6×10^8 CFU/mL, 3×10^6 CFU/mL, 4×10^7 CFU/mL e 3×10^4 CFU/mL para *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. goldcoast*, *S. livingstone*, respectivamente, para dar uma resposta significativa (Figure 12).

Discussão

A velocidade de absorção de bacteriófago FO1 para *Salmonella* spp. provavelmente é dependente da acessibilidade de N-acetil-glicosamina na região de núcleo, o sítio de ligação de FO1 (Lindberg, 1977; Lindberg e Holme, 1969_[AAB11]). Cadeias laterais-O longas e numerosas ocorrendo na região de polissacarídeo do LPS de *Salmonella* selecionada puderam, portanto, prejudicar a ligação de FO1 no analito. Portanto, é esperado que bacteriófagos livres possuirão uma capacidade de ligação variável em cepas de *Salmonella* e que a propagação do vírus dependerá largamente do perfil molecular do LPS exposto.

Quando se imobilizam complexos de LPS-proteína na superfície de um suporte sólido para um método diagnóstico, como descrito na invenção, pode ser formada uma rede densa de ligantes. Na análise Biacore apresentada, a densidade do complexo e o impedimento pelas proteínas podem desempenhar um papel na diferença observada na ligação de bacteriófago em quatro tipos de LPS.

Deve ser observado que, como também discutido na invenção, é esperada a oxidação de constituintes monossacarídeo na região de núcleo, incluindo aquele de N-acetil-glicosamina. O ligante para o bacteriófago é, portanto, afetado e isto pode influenciar a sensibilidade do teste.

Exemplo [AAB12] 8

Propagação de bacteriófago FO1 em cepas de Salmonella e de não-Salmonella

Objetivo

5 A propagação de FO1 não é exclusiva em *Salmonella* spp., mas possivelmente também em cepas de não-*Salmonella* (3). Este estudo foi iniciado para investigar a seletividade da proliferação do bacteriófago FO1. Para este propósito, numerosos patógenos de não-*Salmonella* de alimento foram expostos ao bacteriófago FO1.

10 Métodos

Sete cepas de não-*Salmonella* (*Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter*, *Enterococcus faecalis*, e *Staphylococcus aureus*) e sete cepas de *Salmonella* (*S. cholerasuis*, *S. berta*, *S. meleagridis*, *S. Agona*, *S. pullorum*, *S. Virchow* e
15 *S. enteritidis*) foram crescidas em Caldod e Soja Triptona (Oxoid CM129).

Em t 0 horas, $1,2 \times 10^8$ PFU de FO1 (concentração final de 1×10^6 PFU/mL) foram adicionados em todas as culturas. Cada hora uma amostra foi retirada, e foram determinadas absorbância em λ 600 nm (Figs. 13 e 14), unidades de formação de placa bacteriana/mL (Figs.15 e 16) e, após
20 concentração e troca de tampão, ligação em St-LPS imobilizado sobre uma superfície de chip sensor em um biossensor Biacore biossensor (Fig. 17).

Algumas bactérias de não-*Salmonella*, incluindo *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *Staph. aureus*, não mostraram crescimento em cinco horas de cultura (Fig. 13). Estas bactérias obviamente
25 não foram carregadas nem infectadas pelo bacteriófago FO1, porque a concentração de bacteriófagos não aumentou no decorrer do tempo e ficou estacionária em 1×10^6 PFU/mL (Fig. 15). Em contraste, todos os sorovares *Salmonella*, exceto *S. virchow*, cresceram em cinco horas de incubação (Fig. 14). Esta cepa de *S. virchow* provavelmente foi lisada completamente pelos

bacteriófagos em proliferação, porque um aumento claro na concentração de bacteriófagos pode ser mostrado de 1×10^6 PFU/mL para 1×10^{10} PFU/mL (Fig. 16). Em um modo similar, bactérias *S. berta* e *S. meleagridis* mostraram, um aumento de concentração de bacteriófagos. Contudo, estas bactérias, em particular, *S. berta* mostraram crescimento bom (Fig. 14).

No contexto da invenção, a ligação de bacteriófagos propagados na superfície do sensor é de maior interesse. Para este propósito, bacteriófagos propagados em *Salmonella* foram concentrados, dialisados e serialmente diluídos antes da análise por biossensor SPR (Fig. 17).

Surpreendentemente, concentrações de bacteriófago comparáveis deram respostas de biossensor diferentes dramáticas. Mais provavelmente fagos foram perdidos, em particular durante etapa de concentração e diálise, durante a preparação de amostra. Contudo, as preparações de bacteriófagos, que têm mostrado propagação (cf. Fig. 16) deram respostas claramente mais altas do que a da amostra branca, que continha apenas a concentração inicial de bacteriófagos.

Conclusão

Estes experimentos mostraram que bacteriófagos podem ser usados como uma ferramenta analítica para detectar a presença de *Salmonella* em amostras e que LPS de *Salmonella* imobilizado em uma superfície sólida pode ser usado para sondar o incremento dos bacteriófagos como um resultado de propagação do vírus nas bactérias hospedeiras após um período de incubação curto.

Exemplo 9

Imobilização de LPS derivado de Salmonella sobre glóbulos fluorescentes (luminex) e detecção de anticorpos relatando uma infecção passada ou corrente de Salmonella em várias amostras biológicas^[AAB13]

0. ADVERTÊNCIA E PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

Lipopolissacarídeos são imunógenos potentes, que podem

levar pessoas sensíveis a um choque séptico após ingestão ou inalação. Precauções devem ser feitas para prevenir o contato com estes agentes bioquímicos.

Periodato de sódio é um agente oxidante e pode causar explosões quando contatado com agentes redutores.

O procedimento utiliza cianoboroidreto de sódio. O procedimento deve ser portanto realizado com precauções tais como por exemplo o uso de luvas de mão e uma máscara. Usar esta substância química apenas em uma capela. O material é muito tóxico para organismos aquáticos e pode causar efeito adverso de longa duração em ambiente aquático. O resíduo de solução e de material deve ser disposto como um resíduo perigoso.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os componentes da estrutura antigênica do gênero *Salmonella*, os antígenos somáticos são importantes como um instrumento para traçar resposta imune em animais sob uma infecção invasiva deste microorganismo. Antígenos somáticos estão localizados sobre a parte de polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS), que é um constituinte da parede celular bacteriana. Após extração e isolamento do LPS de sorotipos de *Salmonella* cuidadosamente escolhidos (cf. SOP CHEMIE/A21_[AAB14]), LPS contendo antígeno é copulado covalentemente em glóbulos, que são internamente codificados por uma mistura específica de material fluorescente. A plataforma de tecnologia explorada de Luminex pode identificar até 100 glóbulos diferentemente internamente codificados em um único teste. Uma espécie única de glóbulos pode ser imobilizada com uma mistura de LPS refletindo sorogrupos diferentes, ou espécies de glóbulos diferentes podem ser, cada uma, imobilizadas com LPS refletindo um sorogrupo ou sorovar específico único do microorganismo patogênico. Os glóbulos contendo LPS são incubados com materiais derivados de corpo, tais como sangue, plasma, soro, suco/líquido extraído (*drip*) de carne, gema de ovo, leite etc., para

permitir ligação de antígeno - anticorpo anti-*Salmonella*. A ligação específica é detectada após uma segunda incubação com anticorpos de imunoglobulina fluorescentemente marcados em um dispositivo analisando simultaneamente os comprimentos de onda de emissão de glóbulos excitados e anticorpos marcados. Apenas quando ambas as fluorescências do glóbulo e do anticorpo são detectadas simultaneamente será registrada uma resposta para uma espécie de glóbulo específica.

Este SOP descreve o método para oxidação, imobilização de LPS sobre glóbulos (Luminex) e um ensaio para avaliar a qualidade do produzido.

2. ESCOPO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Para analisar fluidos biológicos, tais como amostras de soro de galinha e porcos, para a presença de anticorpos anti-*Salmonella* reagindo com antígenos somáticos O3, O4, O5, O6, O7, O8, O9, O10 e O12 refletindo uma história de infecção passada ou corrente de *Salmonella* de sorogrupos B, C, D e E.

3. REFERÊNCIAS

Extração e isolamento de lipopolissacarídeos de *Salmonella* spp.;

Imobilização de LPS derivado de *Salmonella* sobre um chip biossensor (biacore) e detecção de anticorpos de soro relatando uma infecção passada ou corrente de *Salmonella*;

Otimização da adição de proteína em LPS para imobilização e detecção de anticorpos de soro; veja Exemplo 1.

4. DEFINIÇÕES

c - concentração em % (m/v), % (v/v), mol/L ou mmol/L como indicado.

5. LISTA DE ABREVIACÕES

5.1 EDC, cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida

5.2 LPS, Lipopolissacarídeos

5.3 NaCl, Cloreto de sódio

5.4 NaOH, Hidróxido de sódio

5.5 NHS, N-hidróxi-succinimida

5 5.6 PBS, Solução salina tamponada com fosfato

5.7 Se, *Salmonella enteritidis*

5.8 Sg, *Salmonella goldcoast*

5.9 Sl, *Salmonella livingstone*

5.10 Sm₇, *Salmonella meleagridis*

10 5.11 SOP, Procedimento operacional padrão

5.12 St, *Salmonella typhimurium*

5.13 TCA, Ácido tricloroacético

6. PRINCÍPIO

15 LPS é oxidado na presença de uma proteína facilitado por periodato de sódio. A solução de LPS-proteína é dessalinizada usando uma coluna NAP-5. Após ativação dos grupos ácido carboxílico na superfície dos glóbulos com o auxílio de cloridrato de 1-etil-3- (3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida - (EDC), N-hidróxi-succinimida (NHS) seguido por uma reação com carbohidrazida, o complexo de LPS-proteína oxidado dessalinizado é

20 imobilizado na fase sólida dos glóbulos. LPS ligado é então estabilizado com cianoboroidreto de sódio. Antes do uso rotineiro, o desempenho do LPS conjugado em glóbulo para ligar anticorpos anti-*Salmonella* é avaliado usando um painel de soros de aglutinação monoclonais de referência.

7. REAÇÕES

25 7.1 OXIDAÇÃO DE GRUPO CARBOIDRATO

Periodato induzirá uma disrupção oxidativa de ligações entre cis-dióis vicinais, em particular, grupos carboidrato, como em e.g. manose, para dar funcionalidades aldeído, veja Figure 18. Esta reação é tipicamente realizada em tampões em uma faixa de pH entre 4,5 e 5,5 no escuro usando

um meta-periodato de sódio 10-100 mM recém-preparado em acetato de sódio 0,1 M.

NOTA 1: As posições de conjugações indicadas na Figura 18, para ligar o monossacarídeo mostrado com os outros resíduos de monossacarídeo em um polissacarídeo, como em e.g. LPS, são aqui apenas dadas como um Exemplo. R' e R indicam as posições distal e proximal, respectivamente, na cadeia de carboidrato. A oxidação de grupos hidroxila em aldeídos pode se repetir dentro da cadeia de polissacarídeo em cada constituinte monossacarídeo contendo dióis vicinais suscetíveis.

NOTA 2: Periodato também oxidará, quando presentes, certos 6-amino-etanol-derivados tais como resíduos de hidróxi-lisina em colágeno, bem como metionina (para seu sulfóxido) e certos tióis (normalmente para dissulfetos). Em adição, resíduos de serina e de treonina N-terminais de peptídeos e proteínas podem ser seletivamente oxidados por periodato a grupos aldeído. Estas reações, contudo, normalmente ocorrem em uma velocidade menor do que a oxidação de dióis vicinais.

7.2 CONJUNGAÇÃO EM PROTEÍNA

Oxidação é realizada na presença de uma proteína. Os compostos de bis-aldeído, tais como os constituintes de monossacarídeo oxidados na cadeia de polissacarídeo de LPS aqui, podem reagir com qualquer grupo amino em uma proteína e podem formar uma ligação de base de Schiff resultando em uma imina substituída. Veja Figura 19.

NOTA: A imina substituída está estabilizada enquanto o complexo estiver ligado na superfície do glóbulo, por uma redução facilitada pelo cianoboroidreto. Este tipo de esquema de reação é conhecido como aminação redutiva.

7.3 IMOBILIZAÇÃO EM GLÓBULOS FLUORESCENTES

Os glóbulos marcados com ácido carboxílico são ativados usando cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil amino-propil)-carbodiimida (EDC)

e N-hidróxi-succinimida (NHS). A ativação é seguida por uma reação com carbohidrazida. As funcionalidades aldeído reativas reagem espontaneamente com a hidrazida para dar hidrazonas, que são então reduzidas para estabelecer as ligações covalentes. veja Figura 20.

- 5 NOTA: A proteína (R") transporta múltiplos grupos $-NH_2$ e pode portanto ser conjugada com múltiplas entidades LPS oxidadas. Por outro lado, a parte de polissacarídeo em LPS pode transportar múltiplos grupos aldeído livres em uma única molécula. Estes grupos aldeído podem serem capturados parcial ou completamente pela camada de hidrazida sobre os
- 10 glóbulos. O resultado líquido pode ser uma rede complexa estável de proteína-LPS covalentemente ligada na superfície do glóbulo.

8. REAGENTES E MATERIAIS

- No procedimento completo apenas reagentes de grau analítico reconhecido e apenas água destilada ou água de pureza equivalente são
- 15 usados, a não ser que seja indicado de outro modo. Referência a uma companhia é apenas para informação e identificação e não implica uma recomendação a não ser que assim declarado.

8.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

- 8.1.1 Ácido acético (J.T. Baker, Deventer, Os Países-Baixos)
- 20 8.1.2 Kit de copulação de amina (Biacore AB, Uppsala, Suécia) consistindo de:
- 8.1.2.1. Frasco contendo 115 mg de N-hidróxi-succinimida (NHS)
- 8.1.2.2. Frasco contendo 750 mg de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida (EDC)
- 25 8.1.2.3. Frasco contendo 10,5 mL, $c = 1$ mol/L, cloridrato de etanol-amina - hidróxido de sódio pH 8,5
- 8.1.3. Kit de calibração Bio-Plex (Bio-Rad, Veenendaal, Os Países-Baixos)
- 8.1.4. Carbohidrazida, CN_4H_6O (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suíça)
- 8.1.5. Sal de sódio de carbóxi-metil-dextrano (Fluka)

8.1.6. Diidrogeno-fosfato de potássio (KH_2PO_4) (Merck, Darmstadt, Alemanha)

8.1.7. Proclin 150 (Supleco, Bellefonte, PA, USA)

8.1.8. Anticorpos Monoclonais anti-antígenos O de *Salmonella*:

5 8.1.8.1. anti-O4 (SIFIN, Berlim, Alemanha)

8.1.8.2. anti-O5 (SIFIN)

8.1.8.3. anti-O6i (SIFIN)

8.1.8.4. anti-O7 (SIFIN)

8.1.8.5. anti-O8 (SIFIN)

10 8.1.8.6. anti-O9 (SIFIN)

8.1.8.7. anti-O10 (SIFIN)

8.1.9. LPS de *Salmonella*, LPS isolado em casa por extração em TCA (SOP CHEMIE/A21) preparado de sorovares de bactérias *Salmonella enteritidis* (Se), *goldcoast* (Sg), *livingstone* (Sl), *meleagridis* (Sm) e *typhimurium* (St) com proteína (SOP CHEMIE/A23)

15

8.1.10. Ig-PE de ovelha anti-camundongo (Chemicon, Boronia, Victoria, Austrália)

8.1.11. Acetato de sódio tri-hidratado (J.T. Baker, Phillipsburgh, NJ, USA)

8.1.12. Cloreto de sódio (Merck)

20 8.1.13. Cianoboroidreto de sódio (NaCNBH_3) (Fluka)

8.1.14. Hidrogeno-fosfato de dissódio (Na_2HPO_4) (Merck)

8.1.15. Hidróxido de sódio, $c = 50 \text{ mmol/L}$ (Biacore)

8.1.16. m-periodato de sódio (NaIO_4) (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Os Países-Baixos)

25 8.1.17. Água é obtida de um sistema de purificação de água Milli Q

8.2. SOLUÇÕES

8.2.1. Solução de ácido acético, $c = 0,1 \text{ g/mL}$: Diluir 1 mL de ácido acético (8.1.1) com 9 mL de água.

8.2.2. Solução tampão acetato, $c = 10 \text{ mmol/L}$, pH 4,0: dissolver 0,272 g de

acetato de sódio tri-hidratado (8.1.11) em 180 mL de água e ajustar para pH 4,0 com ácido acético (8.1.1) e completar para 200 mL com água. Este tampão é estável por aproximadamente seis meses.

8.2.3. Solução de tampão acetato, $c = 1,0 \text{ mol/l}$, pH 5,5: dissolver 13,6 g acetato de sódio tri-hidratado (8.1.11) em 90 mL de água e ajustar para pH 5,5 com ácido acético (8.1.1) e completar para 100 mL com água. Este tampão é estável por aproximadamente seis meses. 8.2.4. Solução de tampão acetato, $c = 100 \text{ mmol/L}$, pH 5,5: diluir 1,0 mL de solução de tampão acetato, $c \approx 1,0 \text{ mol/L}$ (8.2.3) com 9,0 mL de água.

8.2.5. Solução de carbohidrazida, $c = 100 \text{ mmol/L}$: dissolver 9,0 mg de carbohidrazida (8.1.4) em 1.000 μL de água.

8.2.6. Solução de carbohidrazida, $c = 5 \text{ mmol/L}$: diluir 10 μL de solução de carbohidrazida (8.2.5) com 190 μL de água. Preparar imediatamente antes do uso.

8.2.7. Solução de EDC: reconstituir EDC (8.1.2.2.) em 10,0 mL de água.

8.2.7.1. Fracionar alíquotas de 100 μL desta solução (8.2.7) em tubo de polietileno (9.15). Armazenar a -18°C ou em temperatura menor. As alíquotas são estáveis por dois meses. Antes do uso: descongelar alíquotas congeladas e agitá-las cuidadosamente para garantir soluções homogêneas.

8.2.8. Solução de etanol-amina: pipetar 200 μL de solução de etanol-amina de $c = 1 \text{ mol/L}$ (8.1.2.3) em um tubo de polipropileno (9.15)

8.2.9. Solução de NHS: reconstituir NHS (8.1.2.1) em 10,0 mL de água.

8.2.9.1. Fracionar alíquotas de 100 μL desta solução (8.2.9) em tubo de polietileno (9.15). Armazenar a -18°C ou em temperatura menor. As alíquotas são estáveis por dois meses. Antes do uso: descongelar alíquotas congeladas e agitá-las cuidadosamente para garantir soluções homogêneas.

8.2.10. PBS (5.6), $c = 100 \text{ mmol/L}$, pH 7,2: dissolver 67,9 g de cloreto de sódio (8.1.12), 14,7 g de hidrogeno-fosfato de dissódio (8.1.14) e 4,3 g de dihidrogeno-fosfato de potássio (8.1.6) em 1 L de água (8.1.17).

8.2.11. PBS, $c = 10 \text{ mmol/L}$, pH 7,2: diluir 100 mL de PBS 10 vezes concentrado (8.2.10) em 1 L de água (8.1.17).

8.2.12. Ig-PE anti-camundongo, pré-diluída: diluir conjugado fluorescente 5 vezes por misturação de 40 μL de Ig-PE anti-camundongo (0) com 160 μL de PBS (8.2.11).

8.2.13. Cianoboroidreto de sódio, $c = 1.00 \text{ mol/L}$: dissolver 62,8 mg de cianoboroidreto de sódio (8.1.13) em 1.000 μL de solução de acetato 10 mM de pH 4,0 (8.2.2).

8.2.14. Cianoboroidreto de sódio, $c = 100 \text{ mmol/L}$: diluir 180 μL de solução de cianoboroidreto de sódio (8.2.13) com 1.620 μL de solução de acetato, $c = 10 \text{ mmol/L}$, pH 4,0 (8.2.2). Preparar imediatamente antes do uso.

8.2.15. Hidróxido de sódio, $c = 5 \text{ mmol/L}$: Diluir 400 μL de hidróxido de sódio $c = 50 \text{ mmol/L}$ (8.1.15) com 3,6 mL de água em frasco de vidro (9.10).

8.2.16. Solução de m-periodato de sódio, $c = 100 \text{ mmol/L}$: Adicionar 214 mg de m-periodato de sódio (8.1.16) em 10,0 mL de água (8.1.17).

8.2.17. m-Periodato de sódio 'pronto para uso': pipetar 100 μL de m-periodato de sódio, $c = 100 \text{ mmol/L}$ (8.2.16) em um tubo de polipropileno de 1,4 mL (9.14) e secar com um evaporador centrífugo (9.4).

8.2.18. Solução de periodato de sódio, $c = 50 \text{ mmol/L}$: Dissolver periodato de sódio 'pronto para uso' (8.2.17) em 200 μL de solução de acetato, $c = 100 \text{ mmol/L}$ de pH 5,5 (8.2.4). Preparar imediatamente antes do uso.

8.3. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA MONOCLONAL PADRÃO

8.3.1. Anticorpo monoclonal concentrado anti-O5 de *Salmonella* (8.1.8.2): diluir 5 μL de anti-O5 10 vezes pela adição de 45 μL de PBS $c \approx 10 \text{ mmol/L}$, pH 7,2 (8.2.11).

8.3.2. Anticorpo monoclonal anti-O5 de *Salmonella*: 7,5 μL de anti-O5 (8.3.1) 10 vezes diluído pela adição de 67,5 μL de PBS $c \approx 10 \text{ mmol/L}$, pH 7,2 (8.2.11).

8.3.3. Anticorpo monoclonal anti-antígenos O de *Salmonella* (8.1.8): diluir

7,5 μL de cada anticorpo monoclonal (8.1.8.1, 8.1.8.3, 8.1.8.4, 8.1.8.5, 8.1.8.6, 8.1.8.7) com 67,5 μL de PBS (8.2.11) em uma placa de microtítulo (9.20).

8.3.4. Anticorpos monoclonais três vezes diluídos: adicionar 25 μL de solução de anticorpo monoclonal (8.3.2 e 8.3.3) em 50 μL de PBS c $\approx$ 10 mmol/L, pH 7,2 (8.2.11) em cavidades de mesma placa de microtítulo (8.3.3)

8.3.5. Repetir etapa 8.3.4 duas vezes para obter anticorpos 9 e 27 vezes diluídos em cavidades frescas da placa de microtítulo no caso de anti-O4, anti-O6, anti-O7, anti-O8, anti-O9 e anti-O10. No caso de anti-O5, estes fatores de diluição foram de 90 e 270 vezes, respectivamente.

8.3.6 Remover 25 μL da solução mais alta (8.3.5).

8.3.7 As soluções de anticorpo estão agora prontas para uso.

NOTA: Os fatores de diluição final são 100, 300, 900 e 2700 vezes no caso de anti-O5, enquanto que nos outros casos os anticorpos foram finalmente diluídos 10, 30, 90 e 270 vezes comparados com a preparação original (8.1.8).

8.4. MATERIAIS AUXILIARES

8.4.1 Coluna NAP-5 (0,5 mL, Sephadex G-25, Amersham Biosciences).

8.4.2. Glóbulos-COOH (microesferas-COOH de 5,6 μm) números 24, 25, 26, 27 e 28 misturados em mertiolate aquoso 0,01% em $1,25 \times 10^7$ glóbulos/mL (BioRad).

9. EQUIPAMENTO E APARELHAGEM

Referência a uma companhia é apenas para informação e não implica uma recomendação a não ser que enunciada. Aparelhagens e equipamento equivalentes também podem ser apropriados.

9.1. Balança analítica (tipo AE 240, Mettler, Zurique, Suíça)

9.2. BioPlex 200 (Bio-Rad)

9.3. Câmara de contagem Bürker-Türk (Mainit B.V., Wormer, Os Países-Baixos)

9.4. Evaporador centrífugo (Jouan, Saint-Herblain, França)

- 9.5. Pipeta Finn, 5-40 μ L (Labsystems Oy, Helsinki, Finlândia)
- 9.6. Pipeta Finn, 40-200 μ L (Labsystems Oy)
- 9.7. Pipeta Finn, 200-1000 μ L (Labsystems Oy)
- 9.8. Pipeta Finn, 1- 5 mL (Labsystems Oy)
- 5 9.9. Tubo coletor de vidro, 5 mL, tampado (Renes, Zeist, Os Países-Baixos)
- 9.10. Frasco de vidro de diâmetro de 16 mm (Sarstedt B.V., Etten-Leur, Os Países-Baixos)
- 9.11. Gyro rocker SSL3 (Stuart, Barloworld Scientific Ltd. Stone, Staffordshire, Reino Unido)
- 10 9.12. Lamínulas de cobertura de vidro de microscópio (Chance Proper Ltd, Smethwick, Warley, Inglaterra)
- 9.14. Miniagitador com cabeça de copo de mitrotitulador (MS 1, Janke & Kunkel, Staufen, Alemanha)
- 9.15. Tubo de polipropileno, diâmetro de 7 mm, com tampas de pressão
15 (Biacore)
- 9.16. Tubo de polipropileno, 1,4 mL (Micronic, Lelystad, Os Países-Baixos)
- 9.17. Medidor de pH (tipo pH 537, WTW, Weilheim, Alemanha).
- 9.18. Banho de sonicação, Branson 2200 (Branson Ultrasonics B.V., Soest, Os Países-Baixos)
- 20 9.19. Distribuidor de vácuo, para operar várias colunas NAP-5 simultaneamente (tipo SPE-12G, com tampa(s) de PTFE, J.T.Baker).
- 9.20. Placa de poliestireno de microtítulo de fundo em V, de formato de 96 cavidade (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Alemanha)
- 9.21. Misturador-Vórtice (KS-I, Janke & Kunkel)

25 10. PROGRAMA DE COMPUTADOR

A aparelhagem BioPlex é operada com Bio-Plex Manager software 4.1.

11. PROCEDIMENTO

11.1. OXIDAÇÃO E DESSALINIZAÇÃO DE SOLUÇÃO DE LPS

PRECAUÇÃO DE SEGURANÇA:

Lipopolissacarídeos são imunógenos potentes, que podem trazer pessoas sensíveis para um estado de choque séptico após ingestão ou inalação. Precauções devem ser feitas para se prevenir o contato com este agente bioquímico. Periodato de sódio é um agente oxidante e pode causar explosões quando contatado com agentes redutores fortes.

O procedimento utiliza cianoboroidreto de sódio. O procedimento deve ser portanto realizado com precauções tais como por exemplo o uso de luvas de mão e uma máscara. Usar esta substância química apenas em uma capela. O material é muito tóxico para organismos aquáticos e pode causar efeito adverso de longa duração em ambiente aquático. O resíduo de solução e de material deve ser disposto como um resíduo perigoso.

11.1.1. OXIDAÇÃO

11.1.1.1. Adicionar 500 μL de tampão acetato, $c \approx 100 \text{ mmol/L}$, pH 5,5 (8.2.4) em LPS seco (8.1.9); veja precaução de segurança)

11.1.1.2. Agitar com Vórtice (9.21) a solução (11.1.1.1) e sonicar (9.18) por 20 min e observar o processo de reconstituição de modo que todo o LPS seja dissolvido.

11.1.1.3. Adicionar 20 μL de solução de periodato $c \approx 50 \text{ mmol/L}$ (8.2.18) na solução de LPS (11.1.1.2)

11.1.1.4. Agitar com Vórtice (9.21) a solução (11.1.1.3)

11.1.1.5. Incubar sobre gelo por 40 min protegido da luz.

11.1.1.6 Interromper a oxidação por dessalinização da solução (11.1.1.4) como descrito em 11.1.2

11.1.2. DESSALINIZAÇÃO

11.1.2.1. Posicionar a(s) coluna(s) NAP-5 (8.4.1) no distribuidor (9.19).

11.1.2.2. Condicionar a(s) coluna(s) (11.1.2.1) por passagem de três porções de 3 mL de tampão acetato $c \approx 10 \text{ mmol/L}$, pH 4,0 (8.2.2) sobre o leito de coluna em um fluxo gerado apenas por gravidade. Permitir que o tampão

entre completamente no leito de gel.

11.1.2.3. Pipetar 0,5 mL de solução de LPS oxidado (11.1.1.5) para a coluna. Permitir que a amostra entre completamente no leito de gel. O fluxo através da coluna não é coletado.

5 11.1.2.4. Eluir LPS oxidado com 1 mL de tampão acetato $c = 10$ mmol/L, pH 4,0 (8.2.2). Coletar eluato em um tubo de vidro de 5 mL (9.9).

11.1.2.5. Agitar com vórtice (9.21) a solução (11.1.2.4) por 10 s e adicionar 2 μ L de Proclin 150 (8.1.7).

10 11.1.2.6. Quando não usadas imediatamente (11.1.2.5) armazenar as amostras a de 4°C a 7°C.

11.1.2.7. Antes da imobilização, a solução contendo LPS (11.1.2.5) que pode ser usada para diferentes aplicações de espécies e matriz de gel é diluída como indicado nas seguintes Tabelas 34 e 35.

Tabela 34. Quantidade de solução de LPS usada para imobilizar glóbulos para detecção de anticorpos em antígenos O de *Salmonella* em soros de suíno

Tipo de LPS (8.1.9)	Solução de estoque de LPS (11.1.2.6) em μ L	Volume adicionado de tampão acetato, pH 4,0 (8.2.2) em μ L
Se	75	225
Sg	75	225
Sl	75	225
Sm	75	225
St	75	225

Tabela 35. Quantidade de solução de LPS usada para a imobilização em glóbulos fluorescentes para a detecção de anticorpos em soros de galinha reagindo com antígenos O de *Salmonella*.

Tipo de LPS (8.1.9)	Solução de estoque de LPS (11.1.2.6) em μ L	Volume adicionado de tampão acetato, pH 4,0 (8.2.2) em μ L
Se	150	150
Sg	150	150
Sl	150	150
Sm	150	150
St	150	150

11.2. IMOBILIZAÇÃO DE LPS EM GLÓBULOS

20 11.2.1. Glóbulos (8.4.2) são misturados com Vórtice minimamente por 1

minuto.

11.2.2. Transferir uma porção de 300 μL de glóbulos (11.2.1) em um recipiente novo (9.16).

11.2.3. Centrifugar a 14.000 g por 5 min.

5 11.2.4. Remover o sobrenadante cuidadosamente dos glóbulos usando uma pipeta de 200 μL (9.6).

11.2.5. Deixar uma quantidade pequena de solução (10 μL) no frasco e misturar os glóbulos na solução restante sobre um misturador de vórtice (9.21).

10 11.2.6. Descongelar duas porções de 100 μL de EDC (8.2.7.1)

11.2.7. Descongelar duas porções de 100 μL de solução de NHS (8.2.9.1).

11.2.8 Misturar 180 μL de EDC (11.2.6) e 180 μL de NHS (11.2.7).

11.2.9. Transferir 300 μL de mistura de EDC/NHS (11.2.8) nos glóbulos (11.2.4) e suspender vigorosamente usando uma pipeta.

15 11.2.10. Facilitar a reação em um gyro rocker (9.11) por 20 min.

11.2.11. Centrifugar a 14.000 g por 5 min.

11.2.12. Cuidadosamente remover o sobrenadante dos glóbulos, deixar um volume pequeno (ca. 10 μL) sobre o topo de pelota e glóbulos suspensos usando o misturador de vórtice (9.21).

20 11.2.13. Adicionar 300 μL de solução de carbohidrazida 5 mM (8.2.6) nos glóbulos (11.2.12) e suspender vigorosamente usando uma pipeta.

11.2.14. Facilitar a reação em um gyro rocker (9.11) por 20 min.

11.2.15. Centrifugar a 14.000 g por 5 min, remover sobrenadante dos glóbulos, deixar um volume pequeno (ca. 10 μL) sobre o topo de pelota e

25 glóbulos suspensos usando misturador de vórtice (9.21).

11.2.16. Adicionar 300 μL de solução de etanol-amina 1 M (8.2.8) nos glóbulos (11.2.15) e suspender rigorosamente usando uma pipeta.

11.2.17. Facilitar a reação em um gyro rocker (9.11) por 20 min.

11.2.18. Centrifugar a 14.000 g por 5 min, remover sobrenadante dos

glóbulos, deixar um volume pequeno (ca. 10 μL) sobre o topo de pelota e glóbulos suspensos usando um misturador de vórtice (9.21).

11.2.19. Adicionar 300 μL de LPS oxidado diluído em acetato de sódio $c \approx 10$ mmol/L de pH 4,0 (11.1.2.7) e suspender rigorosamente usando uma pipeta.

5 11.2.20. Permitir a reação em um gyro rocker (9.11) por 90 min.

11.2.21. Centrifugar a 14.000 g por 5 min, remover o sobrenadante dos glóbulos, deixar um volume pequeno (ca. 10 μL) sobre o topo de pelota e glóbulos suspensos usando misturador de vórtice (9.21).

10 11.2.22. Adicionar 300 μL de solução de cianoboroidreto de sódio $c = 100$ mmol/L (8.2.14) e suspender rigorosamente usando uma pipeta.

11.2.23 Facilitar a reação em um gyro rocker (9.11) por 60 min.

11.2.24. Centrifugar a 14.000 g por 5 min e cuidadosamente remover o sobrenadante dos glóbulos, deixar um volume pequeno (ca. 10 μL) sobre o topo de pelota e glóbulos suspensos usando misturador de vórtice (9.19).

15 11.2.25. Adicionar 300 μL de PBS (8.2.11).

11.2.26. Adicionar 1 μL de Proclin 150 (8.1.7) e misturar a suspensão.

11.2.27 Os glóbulos estão prontos para testar anticorpos contra *Salmonella* em materiais biológicos.

11.2.28. Contagem de glóbulos copulados com LPS

20 11.2.28.1. Misturar com vórtice suspensões de glóbulos copulados com LPS (11.2.25) e transferir 1 μL em um tubo de 1 mL novo (9.15)

11.2.28.2. Diluir pela adição de 24 μL de PBS $c \approx 10$ mmol/L, pH 7,2 (8.2.11) e misturar.

25 11.2.28.3 Os suportes externos de uma câmara de contagem Bürker-Türk (9.3) são para serem umedecidos com água milliQ (8.1.17) e a lamínula de cobertura de vidro (9.13) é cuidadosamente empurrada para cima da câmara de contagem a partir da frente.

11.2.28.4 Encher uma pipeta com 20 μL de solução de glóbulo (11.2.28.2), cuidadosamente formando uma gota na ponta da pipeta.

11.2.28.5 Esta gota (11.2.28.4) é para ser posicionada entre a lamínula de cobertura de vidro e a câmara de contagem.

11.2.28.6 Como um resultado do efeito capilar o vazio entre a lamínula de cobertura de vidro e a base da câmara é preenchido. Antes de a solução de os
5 glóbulos poderem transbordar nas bordas da seção da câmara, a ponta da pipeta tem que ser removida. Se algumas bolhas de ar forem visíveis ou se o líquido tiver transbordado sobre as bordas para dentro dos sulcos, a câmara tem que ser limpa e a alimentação tem que ser repetida.

11.2.28.7 Posicionar a câmara de contagem cheia sob um microscópio (9.12)
10 para magnificar a imagem com uma objetiva de 10x.

11.2.28.8 A contagem deve ser iniciada no canto esquerdo superior e seguir a direção mostrada pela seta (Figura 23, painel inferior). Contagem pode ser intensificada com iluminação do microscópio reduzida.

11.2.28.9 Contar o número de glóbulos em 16 quadrados (Figura 23, painel
15 superior) dentro de cada área de linha espessa (veja Figura 24).

11.2.28.10 Notas sobre a contagem:

11.2.28.10.1 Usar iluminação de microscópio reduzida para todas as câmaras.

11.2.28.10.2 A diferença das células de contagem nos quadrados grandes e nos quadrados de grupo não pode ultrapassar 10 células.

20 11.2.28.10.3 Checagens duplas têm que ser realizadas em todas as contagens de células. Após contagem das duas malhas de contagem a malha de contagem inferior é para ser contada na mesma maneira como uma checagem. Quando isto é feito deve ser garantido que a câmara não seque. Isto pode ser evitado pelo enchimento da câmara inferior apenas imediatamente antes da
25 contagem e contando após o tempo de sedimentação.

11.2.28.10.4 A diferença entre os totais das contagens para as duas malhas de contagem não deve ultrapassar 10 células. O valor médio das contagens é então usado na fórmula de cálculo ou multiplicado pelo fator correspondente.

11.2.28.11 Multiplicar o número contado (11.2.28.9) pelo fator de diluição

(25 x) dividido pela área contada (1 mm^2) multiplicada pela profundidade da câmara para calcular a concentração de glóbulos por mL.

11.3. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*SALMONELLA*

Nota: Garantir que todos os reservatórios de solvente e de reagente contenham volume suficiente para operação completa do método antes de iniciar o ensaio.

11.3.1. Tornar a aparelhagem BioPlex (9.2) operacional por uma etapa de aquecimento a laser de 30 minutos, seguida por um procedimento de início e calibração com solventes de calibração apropriados (8.1.3) de acordo com o guia rápido.

11.3.2. Misturar e diluir os glóbulos revestidos com LPS (11.2.26) com PBS c = 10 mmol/L, pH 7,2 (8.2.11) de modo que a concentração de cada glóbulo iguale 5.000 por mL.

11.3.3. Transferir 50 μL de mistura de glóbulos (11.3.2) em uma placa de microtítulo já cheia com anticorpo monoclonal anti-antígenos O diluídos (8.3.7).

11.3.4. Incubar por 30 min em um agitador de placa de microtítulo (9.14).

11.3.5. Adicionar 10 μL de Ig-PE anti-camundongo 5 vezes diluída (8.2.12).

11.3.6. Incubar por 15 min em um agitador de placa de microtítulo (9.14).

11.3.7. Nota em registro de cavidades de amostra e seus conteúdos.

11.3.8. Posicionar a placa em BioPlex (9.2), ajustar tempo de contagem máximo em 120 s e contar pelo menos 50 glóbulos por grupo de LPS.

11.3.9. Ativar o programa software para contar a fluorescência de glóbulos, que haviam capturado anticorpos (fluorescentes).

Para uma representação esquemática do procedimento veja a Figura 21.

Respostas típicas de anticorpos monoclonais contra *Salmonella* são apresentadas na Tabela 36.

Tabela 36. Respostas típicas de soros de referência incubadas com glóbulos revestidos com LPS e um anticorpo fluorescente secundário proporcionando o

sinal.

	LPS B	LPS C ₁	LPS C ₂	LPS D
anti-O4	305	76	95	88
anti-O5	6398	78	91	79
anti-O7	86	174	91	98
anti-O8	90	86	1668	91
anti-O9	82	81	82	145

Exemplo 10

OXIDAÇÃO BRANDA POR PERIODATO

O sucesso da ligação final de anticorpos anti-*Salmonella*, e portanto a seleção de infecções invasivas no animal, é muito dependente da oxidação dos constituintes monossacarídeo da parte de polissacarídeo de LPS, e da parte de oligossacarídeo da região de núcleo de LPS. Pode ser deduzido das estruturas descritas para sorotipos diferentes de e.g. *Salmonella* que oxidação pode acarretar uma quebra das estruturas antigênicas, que são, em particular, parte da parte de polissacarídeo de LPS.

Enquanto que a oxidação de hexitóis ocorre rapidamente, piranosídeos, que são predominantemente ocorrentes em LPS de *Salmonella*, necessitam de uma concentração mais alta de periodato para facilitar a oxidação ao mesmo tempo. Piranosídeos, que possuem grupos α -eritro-hidroxila, tais como configurações arabino, galacto ou mano como em LPS de *Salmonella* spp., são mais facilmente oxidados do que os grupos α -treo-hidroxila, tais como variantes xilo ou glico. Deve ser realizado que quando o anel é aberto e funções aldeído para ligação de e.g. moléculas de proteína são criadas, também podem ser criados compostos α -hidróxi-carbonilados, que podem oxidar de novo se periodato ainda estiver presente. Por isso, são aqueles monossacarídeos não-conjugados, que deste modo não são parte de um oligo ou polissacarídeo, que são completamente destruídos por uma oxidação por periodato a ácido fórmico e formaldeído em concentrações suficientemente altas do oxidante. Em concentrações relativamente altas de periodato, 1,3-dicetonas e também dióis di-axiais podem ser oxidados. Uma reação de oxidação ou decomposição mais do que apenas a criação de grupos

aldeído acarretaria, por conseguinte, uma falha na detecção de uma infecção em uma amostra de material biológico a despeito de uma reação de copulação boa em uma fase sólida suportada pela presença de uma molécula contendo poliamina, tal como uma proteína. Em outras palavras, uma reação branda de periodato é necessária para deixar a estrutura antigênica intacta, mas apenas suficiente para permitir uma copulação entre proteína e a fase sólida.

RESULTADOS

LPS de Se, Sg, Sl e St foi oxidado por 40 min em pH 5,5 usando uma faixa de concentrações de m-periodato de sódio. Após oxidação, LPS foi copulado em uma superfície de biossensor e eficiência de imobilização e atividades antigênicas foram monitoradas.

Da Fig. 25 é óbvio que um grau de oxidação maior de LPS de *S. enteritidis* ocasionou um nível de revestimento maior correspondente no chip biossensor. Contudo, a despeito dos níveis de imobilização mais altos, a resposta da sondagem de anticorpo diminui como demonstrado nas Figs. 26 e 27. Para este tipo de LPS foi determinada uma concentração de periodato ótima de 1,8 mM.

Em uma maneira similar, os efeitos de oxidação sobre a imobilização e a atividade antigênica de LPS de *S. goldcoast* foram testados (Figs. 28 e 29). Um ótimo idêntico para a concentração de periodato de sódio verificado foi de 1,8 mM. Resultados similares foram obtidos para *S. livingstone* (Figs. 30 e 31). Aqui também foi verificado um ótimo de m-periodato de 1,8 mM.

Exemplo 11

Extração de lipopolissacarídeos de Salmonella spp.

ADVERTÊNCIA E PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

Salmonella spp., que são usadas neste método de extração para obter lipopolissacarídeos (LPS), pertencem aos microorganismos de classe de risco 2. Microorganismos de classe de risco 2 são descritos como segue:

podem induzir doenças como diarreia e febre, mas disseminação da doença é improvável e há profilaxias efetivas e tratamento possível. O procedimento quando se trabalha com bactérias vivas deve ser portanto realizado com precauções como desinfecção de mãos e de equipamento, com etanol 70%. O resíduo de *Salmonella* spp. viva deve ser destruído ou disposto em autoclave ou como resíduo bioperigoso, respectivamente.

Compostos de LPS são elevadamente pirogênicos e podem causar febre. Para evitar ingestão, tratar soluções aquosas de LPS com cuidado e usar uma máscara quando se trabalha com material sólido. Se qualquer um destes compostos entrar na corrente sanguínea, procurar imediatamente atendimento médico.

0. INTRODUÇÃO

Salmonella é uma bactéria gram-negativa, e sua membrana externa consiste de várias estruturas antigênicas, incluindo flagelos, proteínas de membrana externa e lipopolissacarídeos (LPS). A molécula de LPS consiste de uma parte denominada de lipídeo A, que está embebida no folíolo da membrana externa, uma região de núcleo e polissacarídeo. A região de núcleo é composta de duas ou três hexoses e dois ou três resíduos de monossacarídeos negativamente carregados, de oito carbonos KDO. A região de núcleo liga o lipídeo A nos polissacarídeos, que também é conhecida como a cadeia lateral O. Esta cadeia lateral O é elevadamente variável com respeito ao seu comprimento e à sua composição entre as cepas, mas também dentro de uma cepa influenciada pelas condições de crescimento da *Salmonella*. Apesar da variação, estruturas antigênicas codificadas no PS são únicas para um certo sorovar de *Salmonella*. De fato, estruturas antigênicas O3, O4, O6/7, O8, O9, O10 e O12 representam aproximadamente 90% dos sorovares de *Salmonella* conhecidos em produtos porcinos, em particular, de abatedouros holandeses.

Para detectar uma resposta humoral antígenos O como uma

indicação de uma exposição de animais de fazenda a *Salmonella*, LPS pode ser usado para sondar a ligação de anticorpos produzidos nestas biomolécula. Para este propósito, pode ser extraído LPS de *S. typhimurium* (O4, O5, O12), *S. enteritidis* (O9, O12), *S. livingstone* (O6/O7), *S. goldcoast* (O6, O8) e *S. meleagridis* (O3, O10).

Uma extração feita em casa é muito importante porque LPS de apenas um número limitado de sorovares de *Salmonella* está comercialmente disponível. Em adição, a produção em casa pode garantir uma disponibilidade contínua de tipos de LPS para um ensaio de detecção de anticorpo bem sucedido. O método de extração em casa aqui descrito para este propósito, é baseado em um protocolo descrito por Staub (0). Extratos em ácido tricloroacético (TCA) de LPS contendo 1-10% de contaminação de proteína. Este produto é adequado para imobilização covalente de LPS em uma camada de dextrano carboximetilado revestida sobre uma superfície metálica de ouro de um chip biossensor (veja SOP CHEMIE/A22 (Exemplo 12)). Este chip imobilizado com LPS, em combinação com um sistema de SPR de biossensor óptico Biacore, pode ser usado para rastrear anticorpos contra LPS de *Salmonella* em soros também conhecido como sorologia.

1. ESCOPO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Este método descreve a extração de LPS de vários sorovares de *Salmonella* com o uso de ácido tricloro-acético. LPS extraído é adequado para modificações para facilitar sua imobilização sobre uma superfície de dextrano carboximetilado.

2. REFERÊNCIAS

Staub, A.M., Methods in Carbohydrate Chemistry, 5, 92 (1965)

SOP Chemie/A22: Imobilização de LPS derivado de *Salmonella* sobre um chip biossensor (Biacore) e detecção de anticorpos de soro relatando uma infecção presente ou passada de *Salmonella* (Exemplo 12).

SOP Chemie/A23: Optimização de adição de proteína em LPS para

imobilização e detecção de anticorpos de soro (Exemplo 13).

3. DEFINIÇÕES

c = concentração em % (m/v), % (v/v), mol/L ou mmol/L como indicado.

5 4. LISTA DE ABREVIACÕES

4.1 BGA: Ágar verde brilhante

4.2 BHI: Infusão de cérebro e coração

4.3 BHIa: Ágar de infusão de cérebro e coração

4.4 LPS: Lipopolissacarídeos

10 4.5 NB: Caldo nutriente

4.6 NaCl: Cloreto de sódio

4.7 NaOH: Hidróxido de sódio

4.8 TCA: Ácido tricloro-acético

5. PRINCÍPIO

15 Lipopolissacarídeos (LPS) são produzidos por extração de *Salmonella* com o auxílio de ácido tricloro-acético (TCA). *Salmonella* é cultivada sobre e coletada de placas de ágar de infusão de cérebro e coração. Após várias etapas de lavagem com uma solução salina e várias etapas de centrifugação, TCA é adicionado. A suspensão acidulada é incubada em

20 temperatura baixa por três horas para solubilizar LPS das células bacterianas. A suspensão é centrifugada para remover material celular e o pH é neutralizado. LPS é então parcialmente purificado e concentrado por precipitação em etanol em temperatura baixa. Finalmente, sais e etanol são removidos por diálise, e partículas restantes na solução contendo LPS retido

25 são decantados por centrifugação. O sobrenadante é liofilizado e pesado para determinar a recuperação de LPS produzido.

6. REAGENTES E MATERIAIS

Durante o procedimento, a não ser que seja enunciado de outro modo, são usados apenas reagentes de grau analítico reconhecido e apenas

água destilada ou água de pureza equivalente. Referência a uma companhia é apenas para informação e identificação e não implica uma recomendação a não ser que seja enunciado de outra maneira.

6.1 Compostos químicos

- 5 6.1.1 Ágar verde brilhante (Oxoid, Basingstroke, Inglaterra, CM329)
- 6.1.2 Infusão de cérebro e coração (Oxoid, CM225)
- 6.1.3 Ágar de infusão de cérebro e coração (Oxoid, CM375)
- 6.1.4 Etanol, absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha, 1.00983.2500)
- 6.1.5 Glicerol 87% (Merck, 1.04091.1000)
- 10 6.1.6 Caldo nutriente No. 2 (Oxoid, 67)
- 6.1.7 Cloreto de sódio (Merck, 1.06404.1000)
- 6.1.8 Hidróxido de sódio (Merck, 1.06498.1000)
- 6.1.9 Etileno-glicol (Merck, 9621.2500))
- 6.1.10 Ácido tricloro-acético (Merck, 1.00807.0250)
- 15 6.1.11 Água foi obtida de sistema de purificação Milli Q (8.24)
- 6.2 Soros de aglutinação de *Salmonella*
- 6.2.1 anti-O4 (Pro-Lab diagnostics, *Salmonella* Reference Section of the Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Grã-Bretanha)
- 6.2.2 anti-O5 (Pro-Lab diagnostics)
- 20 6.2.3 anti-O6,7 (Pro-Lab diagnostics)
- 6.2.4 anti-O8 (Pro-Lab diagnostics)
- 6.2.5 anti-O9 (Pro-Lab diagnostics)
- 6.2.6 anti-O12 (Pro-Lab diagnostics)
- 6.2.7 anti-O Poly A-S (anti-soros para grupos A até S) (Pro-Lab diagnostics)
- 25 6.2.8 anti-O Poly E (anti-soros para fatores O3, O10, O15, O19, O 34) (Pro-Lab diagnostics)
- 6.3 Cepas bacterianas
- 6.3.1 *Salmonella enteritidis* (#23, fago tipo 1 cepa RIVM, Os Países-Baixos; 90-16-706)

6.3.2 *Salmonella goldcoast* (Division's working bank, Utrecht University, Os Países-Baixos)

6.3.3 *Salmonella livingstone* (Division's working bank)

6.3.4 *Salmonella melaegridis* (Division's working bank)

5 6.3.5 *Salmonella typhimurium* X-193 (ASG, Lelystad)

6.4 Reagentes

A não ser que seja enunciado de outro modo, todos os meios preparados podem ser armazenados por 3 meses a 2- 8°C.

10 Após dispensação de meio de ágar em placas de Petri, as placas são esfriadas na temperatura ambiente. Após endurecimento do ágar, as placas são invertidas e secas na temperatura ambiente por dois a três dias sobre o topo da bancada.

6.4.1 Placas de ágar verde brilhante (BGA): suspender 52 g de BGA (6.1.1) em 1,0 L de água (6.1.11). Ferver para dissolver o meio completamente.
15 Misturar bem e dispensar porções de 15 mL em placas de Petri (7.29).

6.4.2 Caldo de infusão de cérebro e coração (BHI): dissolver 37 g de caldo BHI (6.1.2) em 1,0 L de água (6.1.11). Misturar bem, distribuir para recipientes finais e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min.

6.4.3 Ágar de infusão de cérebro e coração (BHIIa): suspender 47 g de ágar BHI (6.1.3) em 1,0 L de água (6.1.11). Ferver para dissolver o meio completamente. Misturar bem e dispensar porções de 15 mL em placas de Petri (7.29).
20

6.4.4 Solução de esfriamento: misturar 1,0 L de etileno-glicol (6.1.9) com 3 L de água (7.1.11)

25 6.4.5 Etanol frio em congelador: armazenar 1 L de etanol (6.1.4) em um congelador (-18°C) (7.17)

6.4.6 Glicerol 87% estéril: esterilizar em autoclave 50 mL de glicerol (6.1.5) a 121°C por 15 min.

6.4.7 Caldo nutriente (NB): dissolver 25 g NB (6.1.6) em 1,0 L de água

(6.1.11). Misturar bem, distribuir em frascos de 100 mL e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 min.

6.4.8 Solução salina ($c = 0,9\%$ (m/v)): dissolver 9 g de cloreto de sódio (NaCl) (6.1.7) em 1,0 L de água (6.1.11). Antes do uso, esfriar a solução salina durante a noite em um refrigerador.

6.4.9 Solução de ácido tricloro-acético (TCA), $c = 0,25$ mol/L: dissolver 40,8 g de TCA (6.1.10) em 1,0 L de água (6.1.11).

6.4.10 Solução de ácido tricloro-acético (TCA), $c = 0,50$ mol/L: dissolver 81,7 g de TCA (6.1.10) em 1,0 L de água (6.1.11).

6.4.11 Solução de hidróxido de sódio (NaOH), $c = 5,0$ mol/L: dissolver 40 g de NaOH (6.1.8) em 200 mL de água (6.1.11).

6.4.12 Solução de hidróxido de sódio (NaOH), $c = 0,10$ mol/L: diluir 1,0 mL $c = 5$ mol/L de NaOH (6.4.11) em 49,0 mL de água (6.1.11).

7. EQUIPAMENTO E APARELHAGEM

Referência a uma companhia é apenas para informação e identificação e não implica uma recomendação a não ser que assim enunciado. Aparelhagem e equipamento equivalentes também podem ser apropriados.

7.1 Balança analítica (tipo AE240, Mettler, Zurique, Suíça), faixa de pesagem 0 - 40 g (SOP CHEMIE/011)

7.2 Balança (tipo MCl LC2000P, Sartorius Instrumenten BV, Nieuwegein, Os Países-Baixos)

7.3 Centrífuga de velocidade alta (T-124 Centrikon, Kontron, Zurique, Suíça)

7.4 Centrífuga de supervelocidade (RC-5B, Sorvall, Newton, Connecticut, USA)

7.5 Tubos de polipropileno de centrífuga, para Centrikon 290 mL (253483, Beun de Ronde, Abcoude, Os Países-Baixos)

7.6 Tubos de centrífuga para rotor SM-24, Sorvall (Sorvall)

7.7 Tubos cônicos (50 mL) (Cellstar 210261, Greiner bio-one, Alphen a/d

Rijn, Os Países-Baixos)

7.8 Tubos cônicos (15 mL) (Cellstar 188271, Greiner bio-one)

7.9 Tubos criogênicos (1.8 mL) (Cryo's 122261, Greiner bio-one)

5 7.10 Grampos para membrana de diálise (Part#CB-1050, Cellu Sep, Membrane Filtration Products Inc., Seguin, Texas, USA) Grã-Bretanha

7.11 Tubulação de diálise Spectra/Por MWCO 1000 (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, California, USA)

7.12 Pipeta Finn, 200-1000 µL (Labsystems Oy, Helsinque, Finlândia)

7.13 Pipeta Finn, 40-200 µL (Labsystems Oy, Helsinque, Finlândia)

10 7.14 Pipeta Finn, 5-40 µL (Labsystems Oy, Helsinque, Finlândia)

7.15 Aparelhagem de secagem a seco (7570001, Labconco Corporation, Kansas City, Missouri, USA)

7.16 Congelador -18°C, faixa de congelamento entre -16°C e -25°C (Elbanton, Kerkdriel, Os Países-Baixos)

15 7.17 Congelador -80°C (U57085 Classic, New Brunswick Scientific BV, Nijmegen, Os Países-Baixos)

7.18 Bécher de vidro, 15 L (Schott-Duran, Omnilabo International BV, Breda, Os Países-Baixos)

20 7.19 Lâminas de vidro (AAOOOOO 102E, Menzel-Glaser, Braunschweig, Alemanha)

7.20 Banho de sal e gelo: misturar aproximadamente 150 g de NaCl (7.1.7) com 3 L de gelo triturado após adição de 150 mL de água de torneira

25 7.21 Incubadora a -4°C feita em casa (temperatura medida de líquido de contato em extrato de LPS precipitado em etanol (9.3.37), aproximadamente 1°C)

7.21.1 Refrigerador de circulação; temperatura de ajuste de -4°C (WK230, Lauda, Lauda- Konigshofen, Alemanha)

7.21.2 Núcleo de esfriamento central PROTEAN II (165-1806, BioRad laboratories BV, Veenendaal, Os Países-Baixos)

7.21.3 Caixa de poliestireno & tigela interna plástica de encaixe

7.21.3.1 Sistema inteiro (8.22.1, 8.22.2) foi cheio com solução de esfriamento (7.4.4)

7.22 Agitador magnético (EM3300T, LaboTech B.V., Ochten, Os Países-Baixos)

7.23 Sistema de purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, Ma, USA)

7.24 Medidor de pH (tipo pH 537, WTW, Weilheim, Alemanha)

7.25 Refrigerador (Elbanton)

7.26 Rotor Centrikon (A6.14, Kontron)

7.27 Rotor Sorvall (SM-24, Sorvall)

7.28 Espátula, vidro Drigalski (408014, Omnilabo International BV)

7.29 Placas de Petri (633102, Greiner bio-one)

7.30 Powerpette plus (Jencons, Bedfordshire, England)

7.31 Misturador vórtice (KS-I, Janke & Kunkel, Staufen, Alemanha)

8. PROCEDIMENTO

8.1 Preparação de cultura de estoque

8.1.1 Preparar um isolado de *Salmonella* (6.3) por espalhamento de uma colônia, ou o conteúdo de uma alça de inoculação sobre uma placa BGA (6.4.1).

8.1.2 Inocular a placa (8.1.1) durante a noite a 37°C.

8.1.3 Uma única colônia é retirada da placa (8.1.2) com uma alça de inoculação e suspensa em 100 mL de NB (6.4.7)

8.1.4 Incubar durante a noite a 37°C

8.1.5 Adicionar 50 mL de glicerol (6.4.5) em 100 mL de meio NB cultivado (8.1.4)

8.1.6 Adicionar alíquotas de mistura de cultura/glicerol (8.1.5) em onde tubos estéreis de 14 mL (7.9) (volume de 12,5 mL) e doze tubos estéreis de 1,5 mL (7.10) (volume de 1 mL).

8.1.7 Um dos tubos de 1,5 mL é marcado como banco padrão. O conteúdo

deste tubo apenas será usado para preparar mais alíquotas de 1 mL e 12,5 mL via o método aqui descrito (8.1).

8.1.8 Congelar rapidamente as alíquotas a -80°C (8.1.6) e armazenar até o uso.

5 **8.2 Determinação de pureza de isolado de *Salmonella* por aglutinação**

8.2.1 Pipetar 25 μL (7.15) de solução salina estéril (6.4.8) para cima da lâmina de vidro (7.20).

8.2.2 Suspender uma colônia de *Salmonella* cultivada em placa (8.1.2) na solução salina (6.4.8).

10 8.2.3 Adicionar uma gota única de soro de aglutinação (6.2) usando o sistema de gotejamento de recipiente facilitado

8.2.4 Misturar soros e suspensão por inclinação suave da lâmina para frente e para trás por dois minutos.

15 8.2.5 Determinar aglutinação por procura de formação de agregação em frente de um fundo preto.

8.2.6 Descrever a identidade de cepa de *Salmonella* por comparação dos resultados de agregação com Tabela 37.

20 8.2.7 Quando a identidade da cepa cultivada difere da agregação precipitada em Tabela 37, pode ser concluído que a cultura testada não era (exclusivamente) composta do sorotipo esperado de *Salmonella*. Em tal caso, uma nova cultura de estoque tem que ser preparada.

8.3 Método de extração

8.3.1 Preparar 120 placas de ágar BHI (6.4.3).

25 8.3.2 Descongelar um tubo de 12,5 mL com cultura de estoque de *Salmonella* (8.1.8).

8.3.3 Espalhar 100 μL (7.14) de cultura de estoque (8.1.8) sobre cada placa (8.3.1) com uma espátula (7.29).

8.3.4 Incubar durante a noite a 37°C .

8.3.5 Encher um recipiente de 15 L (7.19) com 10 L de água (6.1.11), e esfriar

para 4-8°C em um refrigerador (7.26) até uso posterior.

8.3.6 Pesar (7.3) seis tubos de centrifugação vazios (7.6) e anotar o peso deles na folha de qualidade (veja Figura 32.).

5 8.3.7 Posicionar os recipientes milliQ (6.1.11) e de TCA (6.4.9, 6.4.10) dentro do banho de sal e gelo preparado (7.21).

8.3.8 Separar vinte placas (8.3.4) das placas incubadas durante a noite e adicionar 1 mL de solução salina em cada placa.

10 8.3.9 Colher as bactérias por raspagem suave (fazendo movimentos circulares) usando uma espátula Drigalski (7.29) sobre o ágar, preparando uma suspensão das bactérias em solução salina.

8.3.10 Coletar a suspensão em um dos seis tubos de centrifugação pré-pesados (8.3.6).

8.3.11 Lavar cada placa (8.3.9) duas vezes com 2 mL de solução salina (6.4.8).

15 8.3.12 Combinar as suspensões (8.3.11) com o conteúdo do tubo de centrifugação (8.3.10).

8.3.13 Repetir 5 vezes as etapas 8.3.8 a 8.3.12 nas placas restantes (8.3.4).

8.3.14 Adicionar 100 mL de solução salina (6.4.8) em cada tubo de centrifugação.

20 8.3.15 Tarar os tubos (8.3.14)

8.3.16 Centrifugar por 15 min a 10.000xg e 4°C (7.4, 7.27).

8.3.17 Decantar o sobrenadante em um recipiente de resíduos.

8.3.18 Suspender cada pelota bacteriana em 10 mL de solução salina (6.4.8) até ser formada uma suspensão uniforme.

25 8.3.19 Adicionar 75 mL de solução salina (6.4.8) em cada tubo de centrífuga.

8.3.20 Repetir uma vez as etapas 8.3.14 a 8.3.19.

8.3.21 Repetir uma vez as etapas 8.3.15 a 8.3.17.

8.3.22 Pesar (7.3) os tubos com pelota bacteriana (8.3.21) e anotar os resultados de peso na folha de qualidade (veja Figura 32)

- 8.3.23 Determinar a massa ($=m$) de bactérias depositadas por subtração do peso do tubo vazio dos tubos contendo células (8.3.22).
- 8.3.24 Suspende as pelotas bacterianas (8.3.22) com x mL (para determinação de x , veja Tabela 38) de água (6.1.11) por sucção e lavagem repetidas com uma pipeta de 10 mL (7.31).
- 8.3.25 Combinar as suspensões dos dois tubos de ensaio em um tubo.
- 8.3.26 Repetir 8.3.25 para os tubos de centrifugação restantes.
- 8.3.27 Adicionar x mL de TCA y M (6.4.10) (veja Tabela 38 para valores de x e y).
- 10 8.3.28 Inserir bastões de agitação em cada uma das suspensões (8.3.27).
- 8.3.29 Agitar as suspensões (8.3.28) por 3 h a 4°C sobre um agitador magnético (7.23).
- 8.3.30 Remover os bastões de agitação.
- 8.3.31 Centrifugar as suspensões por 30 min a $20.000\times g$ e 4°C (7.5, 7.28).
- 15 8.3.32 Coletar os sobrenadantes dos tubos de centrifugação em um bécher de 500-mL.
- 8.3.33 Ajustar o pH do sobrenadante com NaOH 5 M (6.4.11) e NaOH 0,10 M (6.4.12) para pH 6,5.
- 8.3.34 Determinar o volume (v) do sobrenadante de pH ajustado (8.3.33)
- 20 8.3.35 Esfriar o sobrenadante para o ponto de congelamento deixando os frascos cheios (8.3.34) em um congelador a -18°C (7.17) por 30 min
- 8.3.36 Adicionar 2^*e mL (para valores de e veja Tabela 38) de etanol frio em congelador (6.4.5).
- 8.3.37 Esfriar a solução da a -4°C (7.21).
- 25 8.3.38 Dispensar a solução em seis tubos de centrífuga (7.6).
- 8.3.39 Centrifugar a solução por 30 min a $20.000\times g$ e -4°C (7.4, 7.27).
- 8.3.40 Cortar três partes (cada uma de 10 cm de comprimento) do tubo de diálise (7.12)
- 8.3.41 Lavar os tubos de diálise (8.3.40) brevemente com água (6.1.11) e

mantê-los úmidos em água (6.1.11) até uso posterior.

8.3.42 Prender um grampo de membrana (7.11) em uma extremidade do tubo de diálise (8.3.41), deixando 1 cm de tubo livre.

8.3.43 Decantar o sobrenadante (8.3.39) em uma garrafa de resíduo.

5 8.3.44 Remover o sobrenadante restante dos tubos de centrífuga com o auxílio de uma pipeta (7.13).

8.3.45 Adicionar um mL de água (6.1.11) em cada tubo de centrífuga (8.3.44).

10 8.3.46 Suspender as pelotas por sucção e lavagem com uma pipeta de um mL (7.13).

8.3.47 Encher um dos sacos de diálise preparados (8.3.42) com as pelotas ressuspensas (8.3.46) de dois tubos de centrífuga.

15 8.3.48 Lavar cada um dos tubos com $(z-1)/6$ mL (para o valor de z , veja Tabela 38) de água (6.1.11) e combinar a lavagem com o conteúdo do saco de diálise (8.3.47).

8.3.49 Prender outro grampo (6.10) no topo do tubo de diálise cheio (8.3.48) deixando uma bolha de ar pequena entre a solução e o grampo.

8.3.50 Repetir as etapas 8.3.42 a 8.3.49 nos tubos de centrífuga restantes.

20 8.3.51 Deixar os três tubos de diálise cheios em água pré-esfriada (8.3.5) a 4°C.

8.3.52 Incubar o conteúdo de diálise dos tubos (8.3.51) por dois dias sob condições de agitação suave a 4°C sobre um agitador magnético (7.23).

8.3.53 Repor o dialisado pelo menos duas vezes, por troca da água por 7 L de água fresca, pré-esfriada (6.1.11).

25 8.3.54 Coletar o conteúdo dos tubos em um recipiente de 50 mL (7.8).

8.3.55 Dividir o volume coletado (8.3.54) em tubos de centrífuga (7.7).

8.3.56 Centrifugar os tubos a 20.000xg por 30 min a 4°C (7.5)

8.3.57 Pesar um recipiente vazio de 50 mL (7.8) em uma balança analítica (7.2) (sem tampa) e anotar seu peso na folha de qualidade (veja Figura 32)

8.3.58 Coletar o sobrenadante (8.3.56) em recipiente pré-pesado (8.3.57).

8.3.59 Congelar os sobrenadantes em um congelador a -80°C (6.15).

8.3.60 Liofilizar (6.15) os sobrenadantes congelados (8.3.59) até ser observada uma estrutura cristalina branca seca.

5 NOTA: Manusear cuidadosamente o produto de LPS liofilizado, porque suas características eletrostáticas podem fazê-lo suspender em ar.

10 NOTA: LPS é uma toxina bem conhecida, que quando inalada ou engolida pode induzir efeitos clínicos em humanos. Medidas de segurança, tais como máscaras, devem ser rigorosamente seguidas para se evitar qualquer intoxicação.

Pesar o recipiente contendo LPS liofilizado (8.3.60) em uma balança analítica (7.2) e anotar a massa resultante na folha de qualidade (veja Figura 32)

15 8.3.62 Calcular o rendimento de LPS: (peso de LPS (8.3.61) - peso de recipiente (8.3.57))/massa total de células úmidas (8.3.23) * 100%

8.3.63 Armazenar o pó de LPS liofilizado em um recipiente fechado a 4°C até uso posterior.

Uma visão geral do procedimento é mostrada na Figura 33.

20 **Tabela 37.** Folha de checagem das leituras de aglutinação para descrever a identidade das bactérias presentes em termos de espécie de *Salmonella* e sorovar de *Salmonella*

Cepa de <i>Salmonella</i>	Soros de aglutinação							
	O4 (7.2.1)	O5 (7.2.2)	O6,7 (7.2.3)	O8 (7.2.4)	O9 (7.2.5)	O12 (7.2.6)	poly A-S (7.2.7)	poly E (7.2.8)
<i>S. enteritidis</i> (6.3.1)	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>S. goldcoast</i> (6.3.2)	-	-	+	+	-	-	+	-
<i>S. livingstone</i> (6.3.3)	-	-	+	-	-	-	+	-
<i>S. melaegridis</i> (6.3.4)	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> (7.3.4)	+	+	-	-	-	+	+	-

Legenda: + = Formação de agregação, aglutinação positiva

- = Sem formação de agregação, aglutinação negativa

Tabela 38. Tabela de conversão para determinar volumes de água (x), TCA (x), etanol (e) e concentração de TCA (y) para extração e precipitação, e volume de água (z) para procedimentos de diálise para isolar e purificar LPS de *Salmonella*. Letras anotadas: m refere-se à massa (9.3.23), enquanto que v refere-se ao volume de sobrenadante de pH ajustado (9.3.34).

Cepa	Extração		Precipitação	Diálise
	x mL água (6.1.11) e x mL de TCA (6.4.9,6.4.10)	TCA y M	e mL de etanol (6.4.5) (6.1.11)	z mL de água
<i>S. enteritidis</i>	$x \approx m \cdot 5$	0,25 (6.4.9)	$e \approx 2 \cdot v$	$z \approx x \cdot 0,1$
<i>S. goldcoast</i>		0,5 (6.4.10)		
<i>S. livingstone</i>		0,5 (6.4.10)		
<i>S. melaegridis</i>		n.e.y.		
<i>S. typhimurium</i>		0,5 (6.4.10)		

n.e.y.- ainda não estabelecido.

Exemplo 12

- 10 *Imobilização de LPS derivado de Salmonella sobre um chip biossensor (Biacore) e detecção de anticorpos de soro relatando uma infecção de Salmonella passada ou presente*

0. ADVERTÊNCIA E PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

- 15 Lipopolissacarídeos são imunógenos potentes, que podem levar pessoas sensíveis a um choque séptico após ingestão ou inalação. Precauções devem ser feitas para prevenir o contato com este agentes bioquímico.

Periodato de sódio é um agente oxidante e pode causar explosões quando contatado com agentes redutores.

- 20 O procedimento utiliza cianoboroidreto de sódio. O procedimento deve ser portanto realizado com precauções tais como por exemplo o uso de luvas de mão e uma máscara. Usar esta substância química apenas em uma capela. O material é muito tóxico para organismos aquáticos e pode causar efeito adverso de longa duração em ambiente aquático. O resíduo

de solução e de material deve ser disposto como um resíduo perigoso.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os componentes da estrutura antigênica do gênero *Salmonella*, os antígenos somáticos são importantes como um instrumento para traçar resposta imune em animais sob uma infecção invasiva deste microorganismo. Antígenos somáticos estão localizados sobre a parte de polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS), que é um constituinte da parede celular bacteriana. Após extração e isolamento do LPS de sorotipos de *Salmonella* cuidadosamente escolhidos (cf. SOP CHEMIE/A21(Exemplo 11)), LPS contendo antígeno é copulado covalentemente em uma superfície de chip biossensor por meio de sua ligação no LPS contendo antígeno imobilizado sobre a superfície do chip (veja SOP CHEMIE/A23 (Exemplo 13)). Este SOP descreve o método para oxidação, imobilização de LPS sobre o chip biossensor (BIAcore) e a análise de anticorpos em soros.

2. ESCOPO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Para analisar amostras de soro de galinha para a presença de anticorpos anti-*Salmonella* reagindo com antígenos somáticos O4, 5, 6, 7, 8, 9 e 12.

3. REFERÊNCIAS

Concentration Analysis Handbook, Version AA, December 2001, Biacore AB, Uppsala, Suécia

BIA applications Handbook, version AB (reimpresso 1998), Biacore <http://www.jp.>

amershambiosciences.com/tech_support/manual/pdf/dnapuri/52207400af.pdf

SOP Chemie/A21: Extração de lipopolissacarídeos de *Salmonella* spp.(Exemplo 11)

SOP Chemie/A23: Otimização de adição de proteína em LPS para imobilização e detecção de anticorpos de soro (Exemplo 13).

4. DEFINIÇÕES

c - concentração em % (m/v), % (v/v), mol/L ou mmol/L como indicado.

5. LISTA DE ABREVIACÕES

5.1 EDC, cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida

5 5.1.2. NHS: N-hidróxi-succinimida

5.1.3. LPS Se: de bactéria *Salmonella* sorovares *enteriditis*

5.1.4. LPS Sg: de bactérias *Salmonella* sorovares *goldcoast*

5.1.5. LPS Sl: de bactérias *Salmonella* sorovares *livingstone*

5.1.6. LPS Sm: de bactérias *Salmonella* sorovares *meleagridis*

10 5.1.7. LPS St: de bactérias *Salmonella* sorovares *typhimurium*

6. PRINCÍPIO

LPS é oxidado na presença de uma proteína facilitado por periodato de sódio. A solução de LPS-proteína é dessalinizada usando uma coluna NAP-5. O complexo de LPS-proteína é imobilizado sobre um chip
15 CM5 após ativação da camada de dextrano carboximetilado sobre um chip biossensor com o auxílio de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida (EDC) e N-hidróxi-succinimida (NHS) e carbohidrazida. LPS ligado é então estabilizado com cianoboroidreto de sódio. Antes de uso
20 anticorpos anti-*Salmonella* é avaliado usando um painel de soros de aglutinação policlonais.

7. REAÇÕES

7.1 OXIDAÇÃO DE GRUPO CARBOIDRATO

Periodato induzirá uma disrupção oxidativa de ligações entre
25 dióis vicinais, em particular, grupos carboidrato, como em e.g. manose, para dar funcionalidades aldeído. Esta reação é tipicamente realizada em tampões em uma faixa de pH entre 4,5 e 5,5 no escuro usando um meta-periodato de sódio 10-100 mM recém-preparado em acetato de sódio 0,1 M (Figura 18).

NOTA 1: As posições de conjugações indicadas neste

esquema, para ligar este monossacarídeo em um polissacarídeo, como e.g. LPS, são apenas exemplos. R' e R indicam as posições distal e proximal, respectivamente, na cadeia de carboidrato. A oxidação em aldeídos pode se repetir dentro da cadeia de polissacarídeo em cada constituinte monossacarídeo contendo dióis vicinais.

NOTA 2: Periodato também oxidará, quando presentes, certos β -amino-etanol-derivados tais como resíduos de hidróxi-lisina em colágeno, bem como metionina (para seu sulfóxido) e certos tióis (normalmente para dissulfetos). Em adição, resíduos de serina e de treonina N-terminais de peptídeos e proteínas podem ser seletivamente oxidados por periodato a grupos aldeído. Estas reações, contudo, normalmente ocorrem em uma velocidade menor do que a oxidação de dióis vicinais.

7.2 CONJUNGAÇÃO EM PROTEÍNA

Oxidação é realizada na presença de uma proteína. Os compostos de bis-aldeído, tais como os constituintes de monossacarídeo oxidados na cadeia de polissacarídeo de LPS aqui acima, podem reagir com qualquer grupo amino em uma proteína e podem formar uma ligação de base de Schiff resultando em uma imina substituída (Figura 19).

NOTA: A imina substituída está estabilizada enquanto o complexo estiver ligado na superfície de dextrano, por uma redução facilitada pelo cianoboroidreto (aminação redutiva).

7.3. IMOBILIZAÇÃO EM SUPERFÍCIE DE SENSOR

A camada de dextrano carboximetilado localizada em chip sensor é ativada por cloridrato de N-etil-N'-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida (EDC) e N-hidróxi-succinimida (NHS). A ativação é seguida pela preparação com carboidrazida. As funcionalidades aldeído reagem espontaneamente com a hidrazida para dar hidrazonas, que são então reduzidas para estabilizar as ligações covalentes (Figura 34).

NOTA. A proteína R" transporta múltiplos grupos $-NH_2$ e

pode ser portanto conjugada com múltiplas entidades de LPS oxidado. Por outro lado, a parte de polissacarídeo em LPS pode transportar múltiplos grupos aldeído livres em uma única molécula. Estes grupos aldeído podem ser parcial ou completamente capturados pela camada de hidrazida-dextrano. O resultado final pode ser uma rede complexa muito estável de proteína-LPS-dextrano sobre a superfície.

8. REAGENTES E MATERIAIS

No procedimento completo apenas reagentes de grau analítico reconhecido e apenas água destilada ou água de pureza equivalente são usados, a não ser que seja indicado de outro modo. Referência a uma companhia é apenas para informação e identificação e não implica uma recomendação a não ser que assim declarado.

8.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

8.1.1 Ácido acético (J.T. Baker, Deventer, Os Países-Baixos)

8.1.2 Kit de copulação de amina (Biacore AB, Uppsala, Suécia) consistindo de:

8.1.2.1. Frasco contendo 115 mg de N-hidróxi-succinimida (NHS)

8.1.2.2. Frasco contendo 750 mg de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida (EDC)

8.1.2.3. Frasco contendo 10,5 mL, $c = 1$ mol/L, cloridrato de etanol-amina - hidróxido de sódio pH 8,5

8.1.3. Kit de calibração Bio-Plex (Bio-Rad, Veenendaal, Os Países-Baixos)

8.1.4. Carbohidrazida, CN_4H_6eO (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Suíça)

8.1.5. Sal de sódio de carbóxi-metil-dextrano (Fluka)

8.1.6. Glicina, $c = 10$ mmol/L pH 1,5 (Biacore)

8.1.7. Cloridrato de guanidina (Calbiochem, San Diego, CA, USA)

8.1.8. Tampão HEPES contendo tampão HBS-EP (Biacore), $c = 10$ mmol/L, pH 7,4, cloreto de sódio, $c = 150$ mmol/L, EDTA, $c = 3$ mmol/L e tensoativo P20, $c = 0,005\%$ (v/v).

8.1.9. Reagentes de teste monoclonais, específicos anti-grupo de *Salmonella*:

8.1.9.1. anti- *Salmonella* gr. B (SIFIN, Berlim, Alemanha), contém mAb Anti-O4, O5, O27

8.1.9.2. anti- *Salmonella* gr. C (SIFIN), contém mAb Anti-O7, O8

5 8.1.9.3. anti- *Salmonella* gr. D (SIFIN), contém mAb Anti-O9, Vi

8.1.9.4. anti- *Salmonella* gr. E (SIFIN), contém mAb Anti-O3, O19

8.1.10. anti-soros somáticos 'O' monovalentes de *Salmonella*:

8.1.10.1. anti-O4 (Pro-Lab diagnostics, Salmonella Reference Section of the Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Grã-Bretanha)

10 8.1.10.2. anti-O5 (Pro-Lab diagnostics)

8.1.10.3. anti-O6,7 (Pro-Lab diagnostics)

8.1.10.4. anti-O8 (Pro-Lab diagnostics)

8.1.10.5. anti-O9 (Pro-Lab diagnostics)

8.1.10.6. anti-O10 (Pro-Lab diagnostics)

15 8.1.10.7. anti-O12 (Pro-Lab diagnostics)

8.1.10.8. anti-O19 (Pro-Lab diagnostics)

8.1.10.9. anti-O Poly E (O3,O10,O15,O19,O34; Pro-Lab diagnostics)

8.1.11. anti-soros somáticos 'O' polivalentes de *Salmonella*:

8.1.11.1. anti-O Poly A-S

20 (O2,O3,O4,O5,O6,7,O8,O9,O10,O11,O12,O13,O15,
O16,O17,O18,O19,O20,O21,O22,O23,O28,O30,O34,O35,O38,O40,O41;
Pro-Lab diagnostics)

8.1.12. LPS de *Salmonella*, LPS isolado em casa por extração em TCA (SOP CHEMIE/A21 (Exemplo H)) preparado de bactérias *Salmonella* sorovares
25 *enteriditis* (Se), *goldcoast* (Sg), *livingstone* (Sl), *meleagridis* (Sm) e
typhimurium (St) com proteína (SOP CHEMIE/A23, Exemplo 13)

8.1.12.1.1. Alíquotas de 0,5 mg de LPS são armazenadas a + 4°C ou em temperatura menor.

8.1.13. Soros de referência de ave

8.1.13.1. SPF-CH, soro SPF referido como soro de controle negativo (Animal Health Service Ltd. (GD), Deventer, Os Países-Baixos)

8.1.13.2. EIA-SE, soro de controle positivo para *Salmonella enteritidis* de galinha para uso em ELISA (GD)

5 8.1.13.3. EIA-ST, soro de controle positivo para *Salmonella typhimurium* de galinha para uso em ELISA (GD)

8.1.13.4. SPA-PG, soro de controle positivo para *Salmonella pullorum* de galinha para uso em ELISA (GD)

10 8.1.13.5. CH-SI, soro de controle positivo para *Salmonella infantis* de galinha para uso em ELISA (GD)

8.1.14. Acetato de sódio tri-hidratado (J.T. Baker, Phillip sburgh, NJ, USA)

8.1.15. Cloreto de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha)

8.1.16. Cianoboroidreto de sódio (NaCNBH_3) (Fluka)

8.1.17. Hidróxido de sódio, $c = 50 \text{ mmol/L}$ (Biacore)

15 8.1.18. Periodato de sódio. (Sigma Chemical Comp., St. Louis, MO, USA)

NOTA: Este composto químico é sensível à luz. Armazenar este material protegido da luz.

8.1.19. Triton X-100 (Sigma)

8.1.20. Tween 20 (Sigma)

20 8.1.21. Tween 80 (Sigma)

8.1.22. Água é obtida de um sistema de purificação de água Milli Q (MilliQplus)

8.2. SOLUÇÕES

25 8.2.1. Solução de ácido acético, $c = 0,1 \text{ g/mL}$: diluir 1 mL de ácido acético (8.2) com 9 mL de água.

8.2.2. Solução de tampão acetato, $c = 10 \text{ mmol/L}$, pH 4,0: dissolver 0,272 g de acetato de sódio tri-hidratado (8.2.14) em 180 mL de água e ajustar para pH 4,0 com ácido acético (8.3.1) e completar para 200 mL com água. Este tampão é estável por aproximadamente seis meses.

8.2.3. Solução de tampão acetato, $c = 1.0 \text{ mol/l}$, pH 5,5: dissolver 13,6 g de acetato de sódio tri-hidratado (8.2.14) em 90 mL de água e ajustar para pH 5,5 com ácido acético (8.3.1) e completar para 100 mL com água. Este tampão é estável por aproximadamente seis meses.

5 8.2.4. Solução de tampão acetato, $c = 100 \text{ mmol/L}$, pH 5,5: diluir 1,0 mL de solução de tampão acetato, $c = 1,0 \text{ mol/l}$ (8.3.3) com 9,0 mL de água.

8.2.5. Solução de carbohidrazida, $c = 100 \text{ mmol/L}$: dissolver 9,0 mg de carbohidrazida (8.2.4) em 1.000 μL de água.

10 8.2.6. Solução de carbohidrazida, $c = 5 \text{ mmol/L}$: diluir 10 μL de solução de carbohidrazida (8.3.5) com 190 μL de água. Preparar imediatamente antes do uso.

8.2.7. Solução de CHAPS, $c = 0,05\%$ (m/v): dissolver 0,02 g (8.2.3) em 40 mL de HBS-EP (8.2.8).

15 8.2.8. Solução de detergentes, $c = 0,3\%$ (m/v): dissolver 0,3 g de CHAPS (8.2.3), 0,3 g de Tween 20 (8.2.21), 0,3 g de Tween 80 (8.2.22) e 0,3 g de Triton X-100 (8.2.20) em 100 mL de água.

8.2.9. Solução de EDC: reconstituir EDC (8.1.2.2) em 10,0 mL de água.

20 8.2.9.1. Frações de 100 μL desta solução (8.3.9) são armazenadas em tubo de polipropileno (9.12) a -18°C ou em temperatura menor. As alíquotas são estáveis por dois meses.

8.2.9.2. Antes do uso: Descongelar as alíquotas e agitá-las cuidadosamente para garantir soluções homogêneas.

8.2.10. Solução de etanol-amina: pipetar 200 μL de solução de etanol-amina de $c = 1 \text{ mol/L}$ (8.1.2.3) para um tubo de polipropileno (9.12)

25 8.2.11. Solução de guanidina, $c = 6 \text{ mol/L}$: dissolver 17,18 g de cloridrato de guanidina (8.2.7) em 10 mL de solução de detergentes (8.3.8) e ajustar o volume para 30 mL com solução tampão de glicina (8.2.6). Esta solução é estável por aproximadamente três meses.

8.2.12. Solução de NHS: reconstituir NHS (8.1.2.1) em 10,0 mL de água.

8.2.12.1. Fracionar alíquotas de 100 µL desta solução (8.3.12) em tubo de polipropileno (9.12). Armazenar a -18°C ou em temperatura menor. As alíquotas são estáveis por dois meses.

8.2.12.2. Antes do uso: Descongelar as alíquotas e agitá-las cuidadosamente para garantir soluções homogêneas.

8.2.13. Tampão de diluição de amostra: dissolver 2 g de sal de sódio de carbóxi-metil-dextrano (8.2.5), 9,97 g de cloreto de sódio (8.2.15) e 0,1 g de Tween 80 (8.2.22) em 200 mL de HBS-EP (8.2.8).

8.2.14. Cianoboroidreto de sódio, $c = 1.00 \text{ mol/L}$: dissolver 62,8 mg de cianoboroidreto de sódio (8.2.16) em 1.000 µL de solução de acetato de pH 4,0 (8.3.2).

8.2.15. Cianoboroidreto de sódio, $c = 100 \text{ mmol/L}$: diluir 20 µL de solução de cianoboroidreto de sódio (8.3.14) com 180 µL de solução de acetato, $c = 10 \text{ mmol/L}$, pH 4,0 (8.3.2). Preparar imediatamente antes do uso.

8.2.16. Hidróxido de sódio, $c = 5 \text{ mmol/L}$: diluir 400 µL de hidróxido de sódio $c = 50 \text{ mmol/L}$ (8.2.17) com 3,6 mL de água em frasco de vidro (9.10).

8.2.17. Solução de periodato de sódio, $c = 100 \text{ mmol/L}$: adicionar em 214 mg periodato de sódio (8.2.18) 10,0 mL de água.

8.2.18. Periodato de sódio 'pronto para uso': pipetar 100 µL de solução de periodato de sódio, $c = 100 \text{ mmol/L}$ (8.3.17) em um tubo de polipropileno de 1,4 mL (9.13) e secar com um evaporador centrífugo (8.4).

8.2.19. Solução de periodato de sódio, $c = 50 \text{ mmol/L}$: dissolver periodato de sódio 'pronto para uso' (8.3.18) em 200 µL de solução de acetato, $c = 100 \text{ mmol/L}$ pH 5.5 (8.3.4). Preparar imediatamente antes do uso.

8.3. SOLUÇÃO DE REFERÊNCIA PADRÃO

8.3.1. Soros anti-O de *Salmonella*: diluir 20 µL de cada soro (8.2.10 e 8.2.11) em 380 µL de tampão de diluição de amostra (8.3.13) em uma placa de microtítulo (9.18) com a exceção de soro anti-O5: 2 µL deste soro (8.2.10.2) são diluídos em 400 µL de tampão de diluição de amostra (8.3.13).

8.3.2. Reagentes de teste específicos para anti-grupo de *Salmonella*: diluir 4 μL de cada soro (8.2.9.1, 8.2.9.2, 8.2.9.3 e 8.2.9.4) em 395 μL de tampão de diluição de amostra (8.3.13)

8.3.3. Soros de referência de ave: diluir 6 μL de soros (8.2.13.1 e 8.2.13.3) em 295 μL de tampão de diluição de amostra (8.3.13) em uma placa de microtítulo (9.18) e diluir 3 μL de soros (8.2.13.2 e 8.2.13.4) em 295 μL de tampão de diluição de amostra (8.3.13)

8.3.4. Agitar (9.11). Preparar imediatamente antes do uso.

8.4. MATERIAIS AUXILIARES

8.4.1. Coluna NAP-5 (0,5 mL, Sephadex G-25, Amersham Biosciences).

8.4.2. Chips CM5 (Biacore).

9. EQUIPAMENTO E APARELHAGEM

9.1. Referência a uma companhia é apenas para informação e identificação e não implica uma recomendação a não ser que enunciada. Equipamento e aparelhagens equivalentes também podem ser apropriados.

9.2. Balança analítica (tipo AE 240, Mettler, Zurique, Suíça)

9.3. Biacore 3000 (Biacore)

9.4. Evaporador centrífugo (Jouan, Saint-Herblain, France)

9.5. Pipeta Finn, 5-40 μL (Labsystems Oy, Helsinque, Finlândia)

9.6. Pipeta Finn, 40-200 μL (Labsystems Oy)

9.7. Pipeta Finn, 200-1000 μL (Labsystems Oy)

9.8. Pipeta Finn, 1- 5 mL (Labsystems Oy)

9.9. Tubo coletor de vidro, 5 mL, tampado (Renes, Zeist, Os Países-Baixos)

9.10. Frasco de vidro de diâmetro de 16 mm (Biacore)

9.11. Miniagitador com cabeça de copo de microtítulo (MS 1, Janke & Kunkel, Staufen, Alemanha)

9.12. Tubo de polipropileno, diâmetro de 7 mm, com tampas de pressão (Biacore)

9.13. Tubo de polipropileno, 1,4 mL (Micronic, Lelystad, Os Países-Baixos)

9.14. Medidor de pH (tipo pH 537, WTW, Weilheim, Alemanha).

9.15. Banho de sonicação, Branson 2200 (Branson Ultrasonics B.V., Soest, Os Países-Baixos)

5 9.16. Filtro de seringa de 0,45 μm de diâmetro de 25 mm (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA)

9.17. Distribuidor de vácuo, para operar várias colunas NAP-5 simultaneamente (tipo SPE-12G, com tampa(s) de PTFE, J.T.Baker).

9.18. Placa de poliestireno de microtítulo de fundo em V, formato de 96 cavidades (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Alemanha)

10 9.19. Misturador de vórtice (KS-I, Janke & Kunkel)

10. PROGRAMA DE COMPUTADOR

A aparelhagem de biossensor é operada com Biacore 3000 control software 4.1 (1999-2003).

11. PROCEDIMENTO

15 **11.1. OXIDAÇÃO E DESSALINIZAÇÃO DE SOLUÇÃO DE LPS**

PRECAUÇÃO DE SEGURANÇA:

20 Lipopolissacarídeos são imunógenos potentes, que podem levar pessoas sensíveis a um choque séptico após ingestão ou inalação. Precauções devem ser feitas para prevenir o contato com este agentes bioquímico.

Periodato de sódio é um agente oxidante e pode causar explosões quando contatado com agentes redutores.

25 O procedimento utiliza cianoboroidreto de sódio. O procedimento deve ser portanto realizado com precauções tais como por exemplo o uso de luvas de mão e uma máscara. Usar esta substância química apenas em uma capela. O material é muito tóxico para organismos aquáticos e pode causar efeito adverso de longa duração em ambiente aquático. O resíduo de solução e de material deve ser disposto como um resíduo perigoso.

11.1.1. OXIDAÇÃO

11.1.1.1. Adicionar 500 µL de tampão acetato de pH 5,5 (8.3.4) no LPS (8.2.12) (veja precaução de segurança)

11.1.1.2. Agitar com vórtice (9.19) totalmente até a pelota ficar dissolvida.

5 11.1.1.3. Sonicar (9.15) a solução por 10 minutos e julgar a solução para sua transparência.

11.1.1.4. Quando transparência não estiver satisfatória continuar a sonicação até ser obtida uma solução transparente (convalescente).

11.1.1.5. Adicionar 20 µL de solução de periodato (8.3.19) na solução de LPS (11.1.2.4)

10 11.1.1.6. Agitar com vórtice (9.19) a solução (11.1.2.5)

11.1.1.7. Incubar sobre gelo por 40 min protegido da luz.

11.1.1.8. Extinguir a oxidação por dessalinização da solução (11.1.2.6) como descrito em 11.1.3

11.1.2. DESSALINIZAÇÃO

15 11.1.2.1. Posicionar a(s) coluna(s) NAP-5 (8.5.1) no distribuidor (9.17).

11.1.2.2. Condicionar a(s) coluna(s) (11.1.3.1) pela passagem de três porções de 3 mL de tampão acetato (8.3.2) sobre o leito de coluna em um fluxo gerado apenas por gravidade. Permitir que o tampão entre completamente no leito de gel.

20 11.1.2.3. Pipetar 0,5 mL de solução de LPS oxidado (11.1.2.8) sobre a coluna. Permitir que a amostra entre completamente no leito de gel.

11.1.2.4. Eluir o LPS oxidado com 1 mL de tampão acetato (8.3.2). Coletar o eluato em um tubo de vidro de 5 mL (9.9).

11.1.2.5. Misturar com vórtice (9.19) a solução (11.1.3.4) por 10 s.

25 11.1.2.6. Quando não usadas imediatamente (11.1.3.5) armazenar as amostras a de 4°C a TC.

11.1.2.7. Antes da imobilização, a solução contendo LPS é diluída como indicado na seguinte Tabela 39.

Tabela 39.

LPS spp (8.2.12)	µL de solução de estoque (11.1.3.6)	Volume final (111) completado com tampão acetato, pH 4,0 (8.3.2)
Se	25	200
Sg	100	200
Si	100	200
St	100	200
Sm	12,5	200

11.2. IMOBILIZAÇÃO

NOTA: Garantir que todos os reservatórios de solvente e de reagente contenham volume suficiente para realizar o método completamente antes de iniciar o conjunto de ensaios.

NOTE: Palavras escritas em *itálico* referem-se aos comandos do programa de computador e aos menu's etc. de operação de Biacore 3000.

11.2.1. Preparação

11.2.1.1. Descongelar uma porção de EDC (8.3.9.1)

10 11.2.1.2. Descongelar uma porção de solução NHS (8.3.12.1).

11.2.1.3. Posicionar a prateleira Thermo A na posição direita de prateleira (R2) e a prateleira Reagent no meio (RR)

11.2.1.4. *Command* [comando]: conectar um chip CM5 (8.5.2) e revestir com tampão HBS-EP (8.2.8).

15 11.2.1.5. Posicionar a solução de EDC (11.2.1.1) em posição R2A1

11.2.1.6. Posicionar a solução de NHS (11.2.1.2) em posição R2A2.

11.2.1.7. Posicionar um tubo vazio (9.12) em posição R2A3.

11.2.1.8. Posicionar a solução de carbohidrazida (8.2.6) em posição R2A4.

11.2.1.9. Posicionar a solução de etanol-amina (8.2.10) em posição R2A5.

20 11.2.1.10. Posicionar a solução com LPS oxidado (11.1.2.7) em posição R2A6.

11.2.1.11. Posicionar a solução de cianoboroidreto de sódio (8.2.15) em posição R2A7.

25 11.2.1.12. Posicionar a solução de guanidina 6 M (8.2.11) em frasco de vidro (9.10) em posição RR2

11.2.1.13. Posicionar a solução de CHAPS (8.2.7) em frasco de vidro (9.10) em posição RR4

PRECAUÇÃO: Posicionar um tubo descartável sob a saída de resíduo do instrumento para coletar solução usada de cianoboroidreto de sódio. O resíduo de solução deve ser disposto como resíduo perigoso.

11.2.2. Imobilização do chip CM5

11.2. S. *File* [arquivo] (veja Figura 35.) → *New application wizard*

11.2.3.1. *Open Template* [abrir modelo] → Procurar pelo arquivo: Wizard immobilisation, (veja Figura 36) 11.2.3.2. Preencher: Notebook (veja Figura 38)

11.2.3.3. *Run* [executar], *next* [a seguir] em *start* [iniciar]

11.2.3.4. Nota: para ver qual instrução está no wizard faça *Edit* [editar] no lugar de *Run* [executar]

11.2.4. *Save* [gravar] o sensorgrama. Os arquivos de resultado são gravados com a extensão pré-estabelecida *.blr*

11.2.5. O chip está pronto para testar anticorpos contra *Salmonella* em soros.

Nota: Os níveis de imobilização obtidos devem se aproximar dos níveis como indicados na Tabela 40. Caso contrário considerar a imobilização devido à falha de oxidação.

Tabela 40. Níveis de imobilização típicos de lps

LPS spp	Nível de imobilização em RU (desvio padrão) ¹
Se	2365 (959)
Sg	8609 (1969)
Sl	10953 (2135)
St	4836 (1023)

11.3. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SALMONELLA

Nota: Garantir que todos os reservatórios de solvente e reagente contenham volume suficiente para corrida de método completo de soros de referência antes de iniciar o conjunto de ensaios.

11.3.1. Tornar o Biacore operacional com um chip CM5 apropriado.

11.3.2. *File* [arquivo] (veja Figura 36) → *New application wizard*

11.3.2.1. *Open Template* [abrir modelo] → Procurar por arquivo: Wizard control chip immobilization (veja Figura 37)

11.3.2.2. Preencher: Notebook (veja Figura 38)

11.3.2.3. *Run* [executar], *next* [a seguir] *en start* [iniciar]

5 11.3.2.4. Nota: para ver qual instrução está no wizard faça *Edit* [editar] no lugar de *Run* [executar]

11.3.3. *Save* [gravar] o sensorgrama. Os arquivos de resultado são gravados com a extensão pré-estabelecida *‘.blr’*

10 Sensorgrama típico para imobilização de LPS é mostrado em Figura 39, enquanto que um sensorgrama para a análise de um anti-soro é mostrado em Figura 40. Respostas típicas são listadas em Tabela 41.

Tabela 41. Respostas típicas de soros de anticorpos contra *Salmonella*

LPS spp	Soros anti-Salmonella								
	O4	O5	O6,7	O8	O9	O12	O poly E	O poly A-S	Tampão de diluição da amostra
Se	9	-1	10	4	240	243	2	296	-8
Sg	4	-7	606	453	-1	23	4	194	-3
Sl	4	-3	263	-1	2	2	5	105	-8
St	460	526	16	5	5	224	6	287	-5

Exemplo 13

15 *Otimização de adição de proteína em lps para imobilização e detecção de anticorpos de soro*

ADVERTÊNCIA E PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

20 Lipopolissacarídeos (LPS) são elevadamente pirogênicos e podem causar febre. Para evitar ingestão, tratar soluções aquosas de LPS com cuidado e usar uma máscara quando se trabalha com material sólido. Se qualquer um destes compostos entrar na corrente sanguínea, procurar imediatamente atendimento médico.

0. INTRODUÇÃO

25 Estudos recentes indicam que quando proteína é adicionada em LPS antes da oxidação, a imobilização em uma camada de ouro e dextrano carboximetilado é tornada possível e em alguns casos é melhorada. A seguir,

respostas sorológicas também são tornadas possíveis e são melhoradas. O ótimo das respostas sorológicas depende da percentagem de proteína adicionada em LPS. Este efeito de proteína pode ser obtido pela adição de hemoglobina. Hemoglobina é uma proteína naturalmente ocorrente, que pode ser encontrada em todos os vertebrados de sangue quente. Portanto anticorpos anti-hemoglobina de reação cruzada em soros não são esperados em soros.

1. ESCOPO E CAMPO DE APLICAÇÃO

Este método descreve a adição de uma quantidade de hemoglobina para lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por meio de extração em ácido tricloro-acético t (veja SOP Chemie/A21: Extração e isolamento de lipopolissacarídeos (Exemplo H)). A percentagem ótima de hemoglobina é definida como uma mistura reacional dando níveis de imobilização altos em combinação com reação sorológica máxima de soros de controle positivo. Em adição, são descritas a produção e a armazenagem de misturas reacionais de LPS, prontas para serem usadas, para imobilização sobre um chip sensor.

2. REFERÊNCIAS

SOP Chemie/A21: Extração e isolamento de lipopolissacarídeos (versão 3; Exemplo 11)

SOP CHEMIE/A22: Imobilização de LPS derivado de *Salmonella* sobre um chip biossensor (BIACORE) e detecção de anticorpos de soro relatando uma infecção de *Salmonella* corrente ou passada (versão 3; Exemplo 12)

3. LISTA DE ABREVIACÕES

3.1 LPS: Lipopolissacarídeos

3.2 SOP: Procedimento de operação padrão

3.3 NaAc: tampão acetato de sódio

3.4 Hb: Hemoglobina

3.5 mQ: água milliQ

4. PRINCÍPIO

Em SOP Chemie/A21 (Exemplo 11), é descrita a produção de lipopolissacarídeos (LPS) de *Salmonella* spp. LPS extraído é usado como um ligante em uma análise analítica realizada em um sistema Biacore 3000 para detectar anticorpos anti- *Salmonella* em soros derivados de porcos e galinha (veja SOP CHEMIE/A22 (Exemplo 12)). Para melhorar a imobilização de LPS, hemoglobina é adicionada antes da oxidação. Para produzir um estoque grande de material para dar níveis de imobilização, dados sorológicos e desempenho de método reproduzíveis, LPS é fortificado com hemoglobina, dividido em alíquotas e seco antes da armazenagem a 4°C. Para imobilizar um chip, uma das alíquotas é imobilizada e oxidada no modo de batelada.

5. REAGENTES E MATERIAIS

Durante o procedimento, a não ser que seja enunciado de outro modo, usar apenas reagentes de grau analítico reconhecido e apenas água destilada ou água de pureza equivalente. Referência a uma companhia é apenas para informação e identificação e não implica uma recomendação a não ser que assim enunciado.

5.1 Compostos químicos

5.1.1 Ácido acético (J.T. Baker, Deventer, Os Países-Baixos)

5.1.2 Hemoglobina, porcina (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Os Países-Baixos)

20 5.1.3 água MilliQ (0)

5.1.4 Acetato de sódio tri-hidratado (J.T. Baker, Phillipsburgh, NJ, USA)

5.2 Soros de aglutinação de *Salmonella*

5.2.1 Anti-O4 (Pro-Lab diagnostics, *Salmonella* reference section of the Central Veterinary Laboratory, Weybridge, Reino Unido)

25 5.2.2 anti-O5 (Pro-Lab diagnostics)

5.2.3 anti-O6,7 (Pro-Lab diagnostics)

5.2.4 anti-O8 (Pro-Lab diagnostics)

5.2.5 anti-O9 (Pro-Lab diagnostics)

5.2.6 anti-O10 (Pro-Lab diagnostics)

5.2.7 anti-O12 (Pro-Lab diagnostics)

5.2.8 anti-O19 (Pro-Lab diagnostics)

5.2.9 anti-O Poly A-S (anti-soros para grupos A a S) (Pro-Lab diagnostics)

5.2.10 anti-O Poly E (anti-soros para fatores O3, O10, O15, O19, O34) (Pro-

5 Lab diagnostics)

5.3 Anti-soros de *Salmonella* específicos para grupo

5.3.1 Enteroclon anti-grupo B de *Salmonella* (Sifin, Berlin, Alemanha)

5.3.2 Enteroclon anti-grupo C de *Salmonella* (Sifin)

5.3.3 Enteroclon anti-grupo D de *Salmonella* (Sifin)

10 5.3.4 Enteroclon anti-grupo E de *Salmonella* (Sifin)

5.4 Soros de referência de ave

5.4.1 SPF-CH, soro de controle negativo livre de patógeno específico (SPF) (Animal Health Service Ltd. (GD), Deventer, Os Países-Baixos)

15 5.4.2 EIA-SE, controle positivo para *Salmonella enteritidis* de galinha para uso em ELISA (GD)

5.4.3 EIA-ST, controle positivo para *Salmonella typhimurium* de galinha para uso em ELISA (GD)

5.4.4 SPA-PG, controle positivo para *Salmonella pullorum* de galinha para uso em ELISA (GD)

20 5.4.5 CH-SI, controle positivo para *Salmonella infantis* de galinha para uso em ELISA (GD)

5.5 Soros de referência de suíno

5.5.1 Sw-Liv, soro de controle positivo para *Salmonella livingstone* de suíno em ELISA (GD)

25 5.5.2 Sw-Typ, soro de controle positivo para *Salmonella typhimurium* de suíno em ELISA (GD)

5.5.3 Sw-APP, soro de controle positivo para *Actinobacillus pleuropneumoniae* de suíno em ELISA (GD)

5.6 Lipopolissacarídeos

Lipopolissacarídeos (LPS) são extraídos, liofilizados e armazenados como descrito SOP Chemie/A21 (Exemplo 11).

5.6.1 LPS de *Salmonella enteritidis*

5.6.2 LPS de *Salmonella goldcoast*

5 5.6.3 LPS de *Salmonella livingstone*

5.6.4 LPS de *Salmonella meleagridis*

5.6.5 LPS de *Salmonella typhimurium*

5.7 Reagentes

10 5.7.1 Solução de tampão acetato, $c = 10 \text{ mmol/L}$, pH 4.0: dissolver 0,272 g de acetato de sódio tri-hidratado (5.1.4) em 180 mL de MQ (5.1.3) e ajustar para pH 4,0 com ácido acético (5.1.1) e completar para 200 mL com mQ (5.1.3). Este tampão é estável por aproximadamente seis meses a 4°C.

15 5.7.2 Solução de tampão acetato, $c = 1,0 \text{ mol/L}$, pH 5,5: dissolver 13,6 g de acetato de sódio tri-hidratado (5.1.4) em 90 mL MQ (5.1.3) e ajustar para pH 5,5 com ácido acético (5.1.1) e completar para 100 mL com mQ (5.1.3). Este tampão é estável por aproximadamente seis meses a 4°C.

5.7.3 Solução de estoque de hemoglobina, 5 mg/mL: dissolver 5 mg de hemoglobina (5.1.2) em 1 mL de mQ (5.1.3).

5.8 Materiais auxiliares

20 5.8.1 Chips CM5 (Biacore AB, Uppsala, Suécia).

6. EQUIPAMENTO E APARELHAGEM

Referência a uma companhia é apenas para informação e identificação e não implica uma recomendação a não ser assim enunciado. Aparelhagens e equipamento equivalentes também podem ser apropriados.

25 6.1 Evaporador centrífugo (Jouan, Saint-Herblain, França)

6.2 Biacore 3000 (Biacore)

6.3 Pipeta Finn, 40-200 μL (Labsystems Oy, Helsinque, Finlândia)

6.4 Tubo coletor de vidro, 5 mL, 12mm x75 mm com tampa (Renes, Zeist, Os Países-Baixos)

6.5 Instalação MilliQ (Millipore, Bedford, MA, USA)

6.6 Banho de sonicação, Branson 2200 (Branson Ultrasonics, Soest, Os Países-Baixos)

6.7 Misturador vórtice (KS-I, Janke & Kunkel, Staufen, Alemanha)

5 7. PROCEDIMENTO

7.1 Produção de solução de estoque de lipopolissacarídeos

7.1.1 Coletar o LPS produzido (veja SOP Chemie/A21 (Exemplo H)) do refrigerador e deixá-lo aclimatar na temperatura ambiente.

10 7.1.2 Recuperar o peso do LPS produzido (7.1.1) no tubo da folha de dados de qualidade (veja SOP Chemie/A21 (Exemplo H)).

7.1.3 Calcular o volume de mQ a ser adicionado em LPS usando Fórmula 1 (9.1).

7.1.4 Adicionar o volume calculado de mQ (7.1.3) no tubo de LPS (7.1.2) (concentração final de LPS: 5 mg/mL).

15 7.1.5 Agitar com vórtice totalmente até que todo o pó esteja dissolvido.

7.1.6 Sonicar (6.6) a solução por 10 min e julgar a solução para a sua transparência.

7.1.7 Quando a transparência (7.1.6) não for satisfatória continuar a sonicação (6.6) até ser obtida uma solução transparente (convalescente).

20 7.2 Adição de hemoglobina

7.2.1 Preparar quatro diluições de solução de LPS (7.17) (uma para cada canal de fluxo) em tampão de acetato de sódio com conteúdos variáveis de hemoglobina como descrito em Tabela 42 (8) em um tubo de vidro (6.4).

25 7.2.2 A escolha das quantidades iniciais de hemoglobina relativas adicionadas em cada batelada de LPS recém-preparada é dada na Tabela 43 (8).

7.2.3 Completar para um volume total de 500 μ L com mQ (5.1.3) como descrito em Tabela 42 (8).

7.3 Oxidação e dessalinização (veja SOP Chemie/A22; capítulo 10.1 (Exemplo 12))

7.3.1 Iniciar oxidação a partir do ponto 10.1.1.2.

7.4 Imobilização (veja SOP Chemie/A22, capítulo 10.2 (Exemplo 12))

NOTA: Imobilizar LPS oxidado fortificado com quatro quantidades diferentes de hemoglobina (7.3) sobre um chip CM5 (5.8.1) de modo que cada canal de fluxo represente uma quantidade relativa diferente.

7.5 Detecção de anticorpos anti-*Salmonella* (veja SOP Chemie/A22, capítulo 10.3 (Exemplo 12))

7.6 Determinação de percentagem ótima de hemoglobina

7.6.1 Calcular a média e o desvio padrão das 5 respostas relativas de cada um dos soros de aglutinação em (5.2) e dos anti-soros de *Salmonella* específicos para grupo listados em (5.3) por canal de fluxo.

7.6.2 Criar um gráfico de coluna agrupada com sobre o eixo x os nomes dos anti-soros de *Salmonella* específicos para grupo e de aglutinação, e sobre o eixo y a média das unidades de resposta relativa para todas as quantidades relativas diferentes de hemoglobina (7.6.1) (veja para um exemplo: Figura 41).

7.6.3 Calcular a média e o desvio padrão de 4 respostas relativas de cada um dos soros de controle de referência de ave listados em (5.4) e dos soros de referência de suíno listados em (5.5) por canal de fluxo.

7.6.4 Criar um gráfico de coluna agrupada com sobre o eixo x os nomes dos soros de controle de ave e dos soros de controle de suíno, e sobre o eixo y a média das unidades de resposta relativa para todas as percentagens diferentes de hemoglobina (7.6.3) (veja para um exemplo: Figura 42).

7.6.5 Adicionar barras de erro Y em ambos os gráficos agrupados (7.6.2, 7.6.4) pelo uso dos valores de desvio padrão para cada coluna de eixo x (veja para um exemplo: Figuras 41 ou 42).

7.6.6 Copiar as médias calculadas de soros esperados positivos selecionados (veja Tabelas 44 a 46 (8)) e os soros de galinha SPF negativos de todas as quantidades de hemoglobina relativas medidas em uma tabela nova (veja para

um exemplo: Tabela 47 (8).

7.6.7 Subtrair as respostas de soros de galinha SPF (7.6.6) das respostas de soros positivos esperados (7.6.6) (veja para um exemplo: Tabela 48 (8)).

5 7.6.8 Determinar a resposta mais alta por soro positivo por quantidade de hemoglobina relativa e dar a esta um valor de 10 (veja para um exemplo Tabela 49 (8)).

7.6.9 Calcular para o restante dos canais de fluxo os valores relativos pelo uso de fórmula 2a (9.2) (veja para um exemplo Tabela 49 (8)).

10 7.6.10 Calcular a soma de todos os valores relativos por percentagem de hemoglobina (veja para um exemplo Tabela 49 (8)).

7.6.11 A percentagem ótima de hemoglobina (para as quatro percentagens comparadas) é determinado pelo resultado de soma mais alto nas quatro percentagens de hemoglobina / canal de fluxo.

15 7.6.12 Quando as quantidades relativas ótimas de hemoglobina (7.6.11) forem as quantidades de hemoglobina mais altas ou mais baixas comparadas, etapas 7.2 a 7.6.11 têm que ser repetidas com as seguintes condições.

7.6.12.1 No caso de as quantidades de hemoglobina mais baixas para Sg, Sm e Sg (20%) serem as ótimas máximas, as quantidades de 20% e 30% serão repetidas em adição a 0% e 10% de hemoglobina.

20 7.6.12.2 No caso de as quantidades de hemoglobina relativas mais altas para Se e St serem ótimas máximas, as quantidades de 20% e 30% serão repetidas em adição a 40% e 50% de hemoglobina.

25 7.6.12.3 No caso de as quantidades de hemoglobina relativas mais altas para Sg, Sm e Sl serem ótimas máximas, as percentagens de 40% e 50% serão repetidas em adição a 60% e 70% de hemoglobina.

7.6.13 Um ótimo de percentagem de hemoglobina é alcançado:

7.6.13.1 Quando a soma de valores relativos (7.6.8), por quatro quantidades de hemoglobina relativas comparadas, possui o valor mais alto.

7.6.13.2 Dentro da faixa de hemoglobina comparada onde o valor mais alto é

detectado, um nível maior ou menor de adição de hemoglobina também é determinado.

7.7 Preparação de estoque de LPS seco a vácuo com hemoglobina adicionada

5 7.7.1 O volume da solução de LPS restante a 5 mg/mL após determinação de quantidade de hemoglobina ótima é calculado pela subtração do peso de tubo vazio inicial lido da folha de dados de qualidade do peso de tubo mais solução de LPS (7.1.7) (veja SOP Chemie/A21 (Exemplo 11)).

7.7.2 A quantidade de LPS restante é calculada usando a Fórmula 3 (9.3).

10 7.7.3 Calcular a quantidade de hemoglobina a ser adicionada em LPS usando a Fórmula 4 (9.4).

7.7.4 Adicionar a quantidade calculada de hemoglobina (7.7.1) na solução de LPS restante para alcançar uma concentração final, que foi determinada em 7.6.13

15 7.7.5 Inverter, agitar com vórtice e/ou sonicar a solução (7.7.4) até que a hemoglobina esteja totalmente dissolvida.

7.7.6 Dispensar 100 µL em tubos de vidro (6.4).

7.7.7 Secar a solução dispensada (7.7.6) em um secador rotativo a vácuo (6.1) (ponto de aquecimento 1, 15 min., tempo de corrida total: 60 min.)

20 7.7.8 Tampar os tubos e armazenar a 4 - 7°C até uso posterior.

Respostas de linha base típicas de complexos de hemoglobina - LPS de *S. goldcoast* imobilizados em chip CM5 são dadas em Figura 43.

8. Tabelas

25 **Tabela 42.** Adição de hemoglobina (5.7.3), tampão acetato de sódio (5.7.2) e mQ (5.1.3) em LPS (7.2.1) antes da oxidação.

	Porcentagem de hemoglobina									
	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
LPS (0)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
NaAc, 1M pH 5.5 (0)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Hb (5 mg/ml) (0)	0 µl	10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	60 µl	70 µl	80 µl	90 µl
mQ (0)	350 µl	340 µl	330 µl	320 µl	310 µl	300 µl	290 µl	280 µl	270 µl	260 µl

Tabela 43. Quantidades iniciais relativas de hemoglobina adicionadas em LPS.

Cepa de <i>Salmonella</i> proporcionadora de LPS	hemoglobina			
<i>S. enteritidis</i> (0)	0%	10%	20%	30%
<i>S. goldcoast</i> (0)	20%	30%	40%	50%
<i>S. livingstone</i> (0)	20%	30%	40%	50%
<i>S. meleagridis</i> (0)	20%	30%	40%	50%
<i>S. typhimurium</i> (0)	0%	10%	20%	30%

Tabela 44. Resultados esperados de ligação de soro de aglutinação (diluído)

5 em LPS de *Salmonella* imobilizado

	Soros de Aglutinação									
Cepa de <i>Salmonella</i> proporcionadora de LPS	O4 1:20 (5.2.1)	O5 1:20 0 (5.2.2)	O6,7 1:20 (5.2.3)	O8 1:20 (5.2.4)	O9 1:20 (5.2.5)	O10 1:20 (5.2.6)	O12 1:20 (5.2.7)	O19 1:20 (5.2.8)	O poly A-S 1:20 (5.2.9)	O poly E 1:100 (5.2.10)
<i>S. enteritidis</i> (5.6.1)	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>S. goldcoast</i> (5.6.2)	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>S. livingstone</i> (5.6.3)	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>S. melaegridis</i> (5.6.4)	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
<i>S. typhimurium</i> (5.6.5)	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-

Legenda:

+ = ligação positiva de soro em LPS imobilizado

- = nenhuma ligação em LPS imobilizado

+ = soros selecionados a serem usados em determinação de adição ótima de hemoglobina.

Tabela 45. Resultados esperados de ligação de soro de referência de ave (diluído) em LPS de *Salmonella* imobilizado

Cepa de <i>Salmonella</i> proporcionadora de LPS	Soros de referência de ave				
	CH-SPF 1:20 (5.4.1)	EIA-St 1:20 (5.4.3)	EIA-Se 1:200 (5.4.2)	Spg 1:200 (5.4.4)	Si 1:200 (5.4.5)
<i>S. enteritidis</i> (5.6.1)	+	+	+	+	-
<i>S. goldcoast</i> (5.6.2)	-	-	-	-	+
<i>S. livingstone</i> (5.6.3)	-	-	-	-	+
<i>S. melaegridis</i> (5.6.4)	-	-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i> (5.6.5)	-	+	+	+	-

Legenda: + = ligação positiva de soro em LPS imobilizado

- = nenhuma ligação em LPS imobilizado

+/- = soros selecionados a serem usados em determinação de
adição ótima de hemoglobina.

5

Tabela 46. Resultados esperados de ligação de soro de referência de suíno (diluído) em LPS de *Salmonella* imobilizado

Cepa de *Salmonella* proporcionadora de LPS, Soros de referência de ave [sic]

	Soros de aglutinação									
Cepa de <i>Salmonella</i> proporcionadora de LPS	O4 1:20 (5.2.1)	O5 1:20 0 (5.2.2)	O6,7 1:20 (5.2.3)	O8 1:20 (5.2.4)	O9 1:20 (5.2.5)	O10 1:20 (5.2.6)	O12 1:20 (5.2.7)	O19 1:20 (5.2.8)	O poly A-S 1:20 (5.2.9)	O poly E 1:100 (5.2.10)
<i>S. enteritidis</i> (5.6.1)	-	-	-	-	+	-	+	-	±	-
<i>S. goldcoast</i> (5.6.2)	-	-	+	+	-	-	-	-	±	-
<i>S. livingstone</i> (5.6.3)	-	-	±	-	-	-	-	-	±	-
<i>S. maelgrevidis</i> (5.6.4)	-	-	-	-	-	±	-	-	±	+
<i>S. typhimurium</i> (5.6.5)	±	±	-	-	-	-	±	-	+	-

Legenda:

+ = ligação positiva de soro em LPS imobilizado

- = nenhuma ligação em LPS imobilizado

5 +/- = soros selecionados a serem usados em determinação de adição ótima de hemoglobina

Tabela 47. Respostas sorológicas típicas sobre LPS de *Salmonella goldcoast* imobilizado com adições variáveis de hemoglobina (dados de dois chips CM5 preparados)

Hemoglobins (%)	Níveis de imobilização (RU)	O6,7 1:20 (5.2.3)	O8 1:20 (5.2.4)	O poly A-S 1:20 (5.2.9)	anti grupo C de sal - mão (1:100) (5.3.2)	CH-SPF 1:20 (5.4.1)	Sw-Liv (1:20) (5.5.1)
30	4596	273,2	257,1	66,8	76,8	-9,0	53,7
40	4837	262,4	238,3	65,0	67,1	-9,1	51,9
50	6112	271,9	237,5	60,9	71,6	-13,1	47,1
60	9764	221,3	177,8	14,2	41,5	-52,0	10,6
10	2177	179,4	140,0	39,0	55,0	0,5	28,0
20	3469	186,5	143,4	37,4	55,1	-5,3	26,5
30	3690	228,3	186,0	50,1	80,1	-4,7	35,1
40	5922	247,5	198,3	49,7	110,3	-11,2	40,6

Tabela 48. Tabela típica de subtração de CH-SPF de respostas sorológicas positivas selecionadas (dados de Tabela 47) sobre LPS de *Salmonella goldcoast* imobilizado com adições variáveis de hemoglobina (dados de dois chips CM5 preparados).

Hemoglobina (%)	Níveis de imobilização (RU)	O6,7 1:20 (5.2.3)	O8 1:20 (5.2.4)	O poly A-S 1:20 (5.2.9)	anti grupo C de sal - mão (1:100) (5.3.2)	Sw-Liv (1:20) (5.5.1)
30	4596	282,2	266,0	75,8	85,7	62,6
40	4837	271,6	247,4	74,1	76,2	61,0
50	6112	284,9	250,6	74,0	84,6	60,2
60	9764	273,3	229,8	66,2	93,5	62,6
10	2177	178,9	139,5	38,5	54,6	27,5
20	3469	191,8	148,7	42,7	60,4	31,8
30	3690	233,0	190,7	54,8	84,8	39,8
40	5922	258,7	209,5	60,9	121,5	51,8

- 5 **Tabela 49.** Tabela típica de resultados de valores relativos de Tabela 48 (dados de dois chips CM5 preparados)

Hemoglobina (%)	Níveis de imobilização (RU)	O6,7 1:20 (5.3.2)	O8 1:20 (5.2.4)	O poly A-B 1:20 (5.2.9)	anti grupo C de sal- mão (1:100) (5.3.2)	Sw-Liv (1:20) (5.5.1)	Soma
30	4596	10	10	10	9	10	49
40	4837	10	9	10	8	10	47
50	6112	10	9	10	9	10	48
60	9764	10	9	9	10	10	47
10	2177	7	7	6	4	5	30
20	3469	7	7	7	5	6	33
30	3690	9	9	9	7	8	42
40	5922	10	10	10	10	10	50

9. Fórmulas

9.1 Fórmula 1

Cálculo de volume de mQ

$$v = w/5$$

5

v = volume de mQ (5.1.3) (em mL)

w = peso de LPS (7.1.2) (mg) (veja SOP ChemieA21

(Exemplo H))

9.2 Fórmula 2

Cálculo de valor relativo de soros positivos

10

$$Rv = Mv/Mhv * 10$$

Rv = valor relativo

Mv = valor médio (7.6.1)

Mhv = valor mais alto médio (7.6.8)

9.3 Fórmula 3

15

Cálculo de quantidade de LPS restante

$$z = w * 0,005$$

z = quantidade de LPS restante (em mg)

w = peso de solução de LPS restante (7.7.1) (em mg)

9.4 Fórmula 4

20

Cálculo de quantidade de hemoglobina

$$h = y * z * 0,05$$

h = massa de hemoglobina (em mg)

y = percentagem (%) ótima de hemoglobina (%) (7.6.13)

z = quantidade de LPS restante (9.3) (mg)

Descrição das figuras

5 **Figura 1.** Representação esquemática de uma modalidade do método de acordo com a invenção.

Figura 2. Esboço esquemático de BIA para detecção de bactérias usando bacteriófagos como organismos indicadores. Organismos indicadores podem ser cultivados durante a noite ou brevemente.

10 **Figura 3.** Reatividade de LPS oxidado, fortificado com Hb, isolado de *S. typhimurium* (batelada St2003.2) com soros de aglutinação em respostas de biossensor arbitrárias relativas (RU). O nível de fortificação de Hb de LPS durante oxidação é mostrado na figura. A ligação esperada dos soros de aglutinação é mostrada em Tabela 3.

15 **Figura 4.** Curvas ROC de Exemplo 2, Experimento 1. TPF: fração positiva-verdadeira; FPF: fração positiva falsa.

Figura 5. Curvas ROG de Exemplo 2, Experimento 2. TPF: fração positiva-verdadeira; FPF: fração positiva falsa.

20 **Figura 6.** Análise de glóbulos preparados revestidos com LPS de *S. enteritidis* (refletindo sorogrupo D), *S. goldcoast* (refletindo sorogrupo C₂), *S. livingstone* (refletindo sorogrupo C₁), *S. meleagridis* (refletindo sorogrupo E) e *S. typhimurium* (refletindo sorogrupo B). Os sucessos do revestimento e da especificidade do LPS foram testados com anti-soros monoclonais comercialmente disponíveis contra O4 (sorogrupo B), O5 (sorogrupo B), O7 (sorogrupo C₁), O8 (sorogrupo C₂) e O9 (sorogrupo D).
25 Respostas são expressadas em unidades arbitrárias como índice de fluorescência média no eixo Y, enquanto que o eixo X indica o tipo de conjugação de LPS dos glóbulos individuais.

Figura 7. Análise de glóbulos preparados revestidos com LPS

refletindo sorogrupos B, C₁, C₂ e D. A atividade do revestimento foi testada com anti-soros monoclonais contra O4 (sorogrupo B), O5 (sorogrupo B), O7 (sorogrupo C₁), O8 (sorogrupo C₂) e O9 (sorogrupo D). Similar à Figura 6, exceto aumentado nas respostas menores. Notar que a resposta de anti-O5 está abaixo do ponto de corte. Veja para detalhes legenda de Fig. 6.

Figura 8. Comparação de glóbulos revestidos com dois bateladas de oxidação diferentes de LPS oxidado de *S. enteritidis* (refletindo sorogrupo D) e *S. goldcoast* (refletindo sorogrupo C₂), *S. livingstone* (refletindo sorogrupo C₁) e *S. typhimurium* (refletindo sorogrupo B). O revestimento foi testado com anti-soros monoclonais comercialmente disponíveis contra O5 (sorogrupo B), O7 (sorogrupo C₁), O8 (sorogrupo C₂) e O9 (sorogrupo D).

Figura 9. Análise de líquido extraído (*drip*) de carne e soro de galinhas. Anti-soros comercialmente disponíveis usados para injetar líquido extraído de carne e soro. *Drip*, líquido extraído coletado de tecido muscular de uma galinha, que foi testado como livre de *Salmonella* usando métodos ISO padrão; *Drip+CH-SPF*, líquido extraído (*drip*) que foi injetado com soro coletado de galinhas livres de patógeno específico (SPF); CH-SPF, soro obtido de galinhas livres de patógeno (SPF); *DripSPA-PG*, líquido extraído que foi injetado com anti-soro reativo com *S. pullorum* e *S. gallinarum*; *SPA-PG*, anti-soro anti-*S. pullorum* e anti-*S. gallinarum*; *DripCHSi*, líquido extraído que foi injetado com soro de galinha que era sorologicamente positivo para uma infecção de *S. infantis*; *CH-Si*, soro de galinha sorologicamente positivo para *S. infantis*. O eixo X indica o tipo de conjugação de LPS dos glóbulos individuais. Veja Figuras 6, 7 e 8 para mais detalhes.

Figura 10. Análise de soros de suíno injetados com e anti-*S. typhimurium* (barras coloridas de amarelo) e anti-*S. livingstone* (barras coloridas de ciano) comercialmente disponíveis. Em adição, glóbulos em

solução tampão (barras coloridas de azul) e soro de suíno negativo (barras coloridas de púrpura) foram analisados sobre glóbulos que estavam revestidos com LPS representando sorogrupos B, C₁, C₂ e D.

Figura 11. Ligação de bacteriófago FO1 em LPS imobilizado de *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. goldcoast* e *S. livingstone* em um biossensor SPR Biacore. PFU, unidades de formação de placa bacteriana.

Figura 12. Ligação de bacteriófago FO1 em chip biossensor SPR revestido com LPS de *S. typhimurium* após incubação de *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. goldcoast*, *S. Livingstone* com $1,2 \times 10^9$ PFU de bacteriófagos FO1. Linha tracejada indica o valor de corte.

Figura 13. Incubação de bactérias degradadoras e patógenos de alimento diferentes na presença de bacteriófago FO1 específico para *Salmonella* spp. Durante crescimento a densidade óptica em λ 600 nm como uma medida de crescimento bacteriano foi monitorada. bl+FO1, meio branco destituído de bactérias suplementado exclusivamente com bacteriófagos.

Figura 14. Incubação de sorovares de *Salmonella* diferentes na presença de bacteriófago FO1 específico para *Salmonella* spp. Veja para mais detalhes a legenda de Fig. 13.

Figura 15. Incubação de bactérias degradadoras e patógenos de alimento diferentes na presença de bacteriófago FO1 específico para *Salmonella* spp. O número de unidade de formação de placa bacteriana (PFU) foi determinado após uma incubação de 5 h. bl+FO1, meio branco destituído de bactérias suplementado exclusivamente com bacteriófagos.

Figura 16. Incubação de sorovares de *Salmonella* diferentes na presença de bacteriófago FO1 específico para *Salmonella* spp. Veja para mais detalhes a legenda de Fig. 13. Estoque de FO1 não foi incubado.

Figura 17. Análise por biossensor SPR de bacteriófago FO1 propagado em sorovares de *Salmonella* diferentes após concentração e diálise dos vírus. As suspensões foram serialmente diluídas e analisadas; as

concentrações finais de bacteriófagos concentrados / diluídos são indicadas no eixo X.

Figura 18. Oxidação de grupo carboidrato. R' e R indicam as posições distal e proximal, respectivamente, na cadeia de carboidrato.

5 **Figura 19.** Conjugação em uma molécula contendo poliamina (R"), tal como uma proteína

Figura 20. Imobilização em glóbulos fluorescentes e estabilização de ligações químicas.

10 **Figura 21.** Representação esquemática do procedimento de copulação de LPS em glóbulos e análise de soro.

Figura 22a. Exemplos de bacteriófagos infectadores de *Campylobacter*.

Figura 22b. Exemplos de bacteriófagos infectadores de *Listeria*.

15 **Figura 22c.** Exemplos de bacteriófagos infectadores de *Salmonella*.

Figura 23. Câmara de contagem e técnica.

Figura 24. Área total de uma câmara de contagem de Bürker-Türk (A) de 1 mm², na qual B representa a área de 1/16 da área total.

20 **Figura 25.** Efeito de concentração de periodato sobre a imobilização de LPS de *S. enteritidis* sobre um chip biossensor SPR.

25 **Figura 26.** Efeito de concentração de periodato sobre a atividade antigênica de LPS imobilizado de *S. enteritidis* (batelada Se2002.1). LPS foi imobilizado em um chip biossensor e analisado em um biossensor SPR (Fig. 25). Faixa testada foi 0,2 mM a 1,8 mM de periodato de sódio. O9, O12, O poly A-S, *S. typh*, SE, resposta de biossensor de anti-soros anti-O9; anti-soros anti-O12, anticorpo policlonal contra sorogrupos A a S, soro de galinha positivo para *S. typhimurium* e soro de galinha positivo para *S. enteridis*, respectivamente.

Figura 27. Efeito de concentração de periodato sobre a atividade antigênica de LPS imobilizado de *S. enteritidis* (batelada Se2002.1). Faixa testada foi 1,8 mM a 48,6 mM de periodato de sódio. Veja para mais detalhes Fig. 26.

5 **Figura 28.** Efeito de concentração de periodato sobre a imobilização de LPS de *S. goldcoast* sobre um chip biossensor, SPE.

Figura 29. Efeito de concentração de periodato sobre a atividade antigênica de LPS imobilizado de *S. goldcoast* (batelada Sg2002.1). LPS foi imobilizado em um chip biossensor e analisado em um biossensor
10 SPR (Fig. 28). Faixa testada foi 0,2 mM a 5,4 mM de periodato de sódio. O6,7, O8, O poly A-S, *S. livingstone*, *S. infantis*, resposta de biossensor de anti-soros anti-O6/7; anti-soros anti-O8, anticorpo policlonal contra sorogrupos A a S, soro porcino positivo para *S. livingstone* e soro de galinha positivo para *S. infantis*, respectivamente.

15 **Figura 30.** Efeito de concentração de periodato sobre a imobilização de LPS de *S. livingstone* sobre um chip biossensor SPR.

Figura 31. Efeito de concentração de periodato sobre a atividade antigênica de LPS imobilizado de *S. goldcoast* (batelada Sg2002.1). LPS foi imobilizado em um chip biossensor e analisado em um biossensor
20 SPR (Fig. 30). Faixa testada foi 0,2 mM a 5,4 mM de periodato de sódio. O6,7, O8, O poly A-S, *S. livingstone*, *S. infantis*, resposta de biossensor de anti-soros anti-O6/7; anti-soros anti-O8, anticorpo policlonal contra sorogrupos A a S, soro porcino positivo para *S. livingstone* e soro de galinha positivo para *S. infantis*, respectivamente.

25 **Figura 32.** Apresentação esquemática do procedimento.

Figura 33. Folha de qualidade para processo de extração de LPS.

Figura 34. Imobilização de LPS em superfície de biossensor e estabilização de ligações químicas.

Figura 35. Biacore 3000 control software em COM 1.

Figura 36. Immobilization wizard.

Figura 37. Immobilization test wizard.

Figura 38. Logging [conexão].

5 **Figura 39.** Sensorgrama típico de imobilização de LPS.
Pontos de relatório: 1. linha base; 2. ativação EDC/NHS; 3 carbohidrazida; 4 etanol-amina; 5 Imobilização de LPS Se.

Figura 40. Sensorgrama de anti-O Poly A-S de *Salmonella* analisado em um chip CM5 contendo LPS.

10 **Figura 41.** Respostas sorológicas típicas de soros de aglutinação e anti-soros de *Salmonella* específicos para grupo em um chip biossensor CM5 contendo imobilizado hemoglobina - LPS de *S. goldcoast*.

Figura 42. Respostas sorológicas típicas de soros de referência de ave (soros SPF-CH, EIA St, EIA Se, SPA -PG e CH-Si) e soros de
15 referência de suíno (soros SW) em um chip biossensor CM5 contendo imobilizado hemoglobina - LPS de *S. goldcoast*.

Figura 43. Respostas de linha base típicas de um chip biossensor CM5 contendo imobilizado hemoglobina - LPS de *S. goldcoast*.

Referências

- 20 Barrow, P., 2000. Serological diagnosis of *Salmonella* by ELISA and other tests. Em: Wray, C, Wray, A. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Oxon, p. 407.
- Barrow, P.A., Desmidt, M., Ducatelle, R., Guittet, M., van der Heijden, H.M., Holt, P.S., Huis in't Velt, J.H., McDonough, P., Nagaraja, K. V., Porter, R.E.,
25 Proux, K., Sisak, F., Staak, C, Steinbach, G., Thorns, C.J., Wray, C, van Zijderveld, F., 1996. World Health Organisation-supervised interlaboratory comparison of ELISAs for the serological detection of *Salmonella enterica* serotype enteritidis in chickens. *Epidemiol. Infect.* 117, 69.
- Berends, B.R., van Knapen, F., Mossel, D.A., Burt, S.A., Snijders, J.M.,

1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 219.

5 de Vries, N., Zwaagstra, K.A., Huis in't Veld, J.H., van Knapen, F., van Zijderveld, F.G., Kusters, J. G., 1998. Production of monoclonal antibodies specific for the i and 1,2 flagellar antigens of *Salmonella typhimurium* and characterization of their respective epitopes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5033.

10 Edel, W., van Leeuwen, W.J., Hoogenboom Verdegaal, A.M., 1993. The annual incidence of salmonellosis in humans in The Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskde.* 118, 306.

15 Fratomico, P.M., Strobaugh, T.P., Medina, M.B., Gehring, A.G., 1997. Real-time detection of *Escherichia coli* O157:H7 using a surface plasmon resonance biosensor. Book of Abstracts, 214th ACS National Meeting, Las Vegas, NV, September 7 - 11, AGFD.

Grimont, P., Grimont, F., Bouvet, P., 2000. Taxonomy of the genus *Salmonella*. Em: Wray, C, Wray, A. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Oxon, p. 1.

20 Holt, P., 2000. Host susceptibility, resistance and immunity to *Salmonella* in animals. Em: Wray, C, Wray, A. (Eds.), *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Oxon, p. 73.

Hoogenboom Verdegaal, A.M., de Jong, J.C., During, M., Hoogenveen, R., Hoekstra, J.A., 1994. Community-based study of the incidence of gastrointestinal diseases in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 112, 481.

25 Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P., Wilkins, E., 1999. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 14, 599.

Jongerius-Gortemaker, B.G.M., B.G., Goverde, R.L., van Knapen, F., Bergwerff, A.A., 2002. surface plasmon resonance (BIACORE) detection of serum antibodies against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*,

J. Immunol. Meth. 266, 33-44

Kamerling JP, Vliegthart JFG, Carbohydrates. In Clinical Biochemistry, Principles, Methods, Applications. Mass Spectrometry, edited by Lawson AM (Walter de Gruyter, Berlin, 1989), vol. 1, pp. 175-263.

- 5 Kretschmann, E., Raether, H., 1968. Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light. Z. Naturforsch. A 23, 2135.

Liedberg, B., Nylander, C, Lundstroem, I., 1983. surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. Sens. Actuators 4, 299.

Medina, M.B., 1997. SPR biosensor: food science applications. Food Test.

- 10 Anal. 3, 14.

Medina, M.B., Van Houten, L., Cooke, P.H., Tu, S.I., 1997. Realtime analysis of antibody binding interactions com immobilized E. coli O157:H7 cells using the BIAcore. Biotechnol. Technol. 11, 173.

- 15 Popoff, M.Y. (2001) In: Antigenic formulas of the Salmonella serovars, 8th revision. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris, France, pp. 150.

Staub, A.M. (1965) Bacterial lipido-proteino-polissacarídeos ('O' somatic antigens): extraction com ácido tricloro-acético. Em Whistler,R.L. (ed.), Methods in Carbohydrate Chemistry, Volume V. Academic Press, New York, pp. 92-93

- 20 Thorns, C.J., Bell, M.M., Sojka, M.G., Nicholas, R.A., 1996. Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Salmonella enteritidis infections in chickens based on antibodies to SEF14 fimbrial antigen. J. Clin. Microbiol. 34, 792.

- 25 van Asten, A.J., Zwaagstra, K.A., Baay, M.F., Kusters, J.G., Huis in't Veld, J.H., van der Zeijst, B.A., 1995. Identification of the domain which determines the g,m serotype of the flagellin of Salmonella enteritidis. J. Bacteriol. 177, 1610.

Van Pelt, W., Van de Giessen, A., Van Leeuwen, W., Wannet, W., Henken,

A., Evers, E., De Wit, M., Van Duynhoven, Y., 1999. Oorsprong, omvang en kosten van humane salmonelloses Deel 1. Oorsprong van humane salmonellose met betrekking tot varken, rund, kip, ei en overige bronnen. Infectieziekten Bull. 10, 240.

- 5 W. van Pelt, W. J.B. Wannet, A. W. van de Giessen, Y.T.H.P. van Duynhoven, 2003. Trends in gastroenteritis in The Netherlands Lowest incidences in 2002 ever; the lull before the storm? Infectieziekten bull. 14, 424.

Wilkins S. G., 1996, Bacterial lipopolysaccharides- Themes and variations.

- 10 Progress in Lipid Research, volume 35, issue 3, sept, p. 283-343

Yamane, Y., Awamura, N., Fujö, H., Ohta, H., Toyota, Y., Otsuki, K, Inoue, T., 2000. Establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay com a coated deflagellated Salmonella enteritidis antigen for detection of a specific chicken antibody. De ave Dis. 44, 291.

- 15 Referências Exemplo 2

Baay, M.F., Huis in 't Veld, J.H. (1993) Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of Salmonella enteritidis in poultry. J. Appl. Bacteriol. 74, 243.

- 20 Bergwerff, A. A., van Knapen, F. (2006) surface plasmon resonance Biosensors for Detection of Pathogenic Micro-organisms: Strategies to Secure Food and Environmental Safety. J. A.O.A.C. Int., accepted for publication.

Bergwerff, A.A., van Knapen, F. (2003) Sensing pathogens: Screening strategies in food and environmental safety. Biacore Journal 2, 10-15.

- 25 Bokkers, E.G.M. (2002). The Action Plan Salmonella Poultry Layer Sector, 2001+. Dutch Product Board for Livestock, Meat and Eggs. Available from http://bedrijfsnet.pve.agro.nl/pls/pbs/docs/folder/BEDRIJFSNET_US_CA/HOO_FDTHEMAS/KWALITEIT_VOEDSELVEILIGHEID/Salmonella_CAMPYLOBACTER/ACTIEPLANNEN/EIERSECTOR/ARTIKEL_ACTIEPLANSALMONELLA_EIERSECTOR2001.PDF. Em Dutch.

Last visited: December 2005

- Desmidt, M., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., de Groot, P.A., Verlinden, M., Wijffels, R., Hinton, M., Bale, J.A., Allen, V.M. (1996) Detection of antibodies to *Salmonella enteritidis* in sera and yolks from experimentally and naturally infected chickens. *Vet. Rec.* 138, 223-6.
- 5 Van Duijkeren E., Wannet, W.J., Houwers, D. J., van Pelt, W. (2002). Sorotipo and fago tipo distribution of *Salmonella* strains isolated from humanos, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3980-5.
- 10 Van Duynhoven, Y.T., de Jager, CM., Kortbeek, L.M., Vennema, H., Koopmans, M.P., van Leusden, F., van der Poel, W.H., van den Broek, M.J. (2005) Explosie Project Team. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 133, 9-21.
- Fischer, I.S.T. (2004) International trends in *Salmonella* sorotipos 1998-2003 - a surveillance report from the Enter-net international surveillance network. *Euroroundup* 9, 9-10.
- 15 Gast, R.K., Nasir, M.S., Jolley, M.E., Holt, P.S., Stone, H.D. (2002) Detection of experimental *Salmonella enteritidis* and *S. typhimurium* infections in laying hens by fluorescence polarization assay for egg yolk antibodies. *Poult. Sci.* 81, 1128-31.
- 20 Gast, RK, Porter, R.E. Jr., Holt P.S. (1997) Applying tests for specific yolk antibodies to predict contamination by *Salmonella enteritidis* in eggs from experimentally infected laying hens. *De ave Dis.* 41, 195-202.
- Gast, R.K., Beard, CW. (1991) Detection of *Salmonella* sorogrupo D-specific antibodies in the yolks of eggs laid by hens infected com *Salmonella enteritidis*. *Poult. Sci.* 70, 1273-6.
- 25 Guerin, M.T., Martin, S.W., Darlington, G.A., Rajic, A. (2005). A temporal study of *Salmonella* serovars in animals in Alberta between 1990 and 2001. *Can. J. Vet. Res.* 69,88-99.

- Hassan, J.O., Barrow, P.A., Mockett, A.P., McLeod, S. (1990) Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. *Vet. Rec.* 126, 519.
- Holt, P.S., Stone, H.D., Gast, R.K., Greene, CR. (2000) Application of the ágar gel precipitin test to detect antibodies to *Salmonella enterica* sorovar enteritidis in serum and egg yolks from infected hens. *Poult. Sci.* 79, 1246-50.
- 5 Jongerius-Gortemaker, B. G., Goverde, R.L., van Knapen, F., Bergwerff, A.A. (2002) surface plasmon resonance (biacore) detection of serum antibodies against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *J.*
- 10 *Immunol. Meth.* 266, 33-44.
- Li, Z.Z., Gong, F.C, Shen, G.L., Yu, R.Q. (2002) Bacteria-modified amperometric immunosensor for a *Brucella melitensis* antibody assay. *Anal. Sci.* 18, 625-30.
- Liu, G.D., Wu, Z.Y., Wang, S.P., Shen, G.L., Yu, R.Q. (2001) Renewable
- 15 amperometric immunosensor for *Schistosoma japonium* antibody assay. *Anal. Chem.* 73, 3219-26.
- Metz, C.E., Herman, B.A., Roe, CA. (1998) Statistical comparison of two ROC curve estimates obtained from partially-paired datasets. *Med. Decis. Making* 18, 110-121
- 20 Van Pelt, W., van de Giessen, A., van Leeuwen, W., Wannet, W., Henken, A., Evers, E., de Wit, M., van Duynhoven, Y. (1999) Oorsprong, omvang en kosten van humane salmonellose. Deel 1. Oorsprong van humane salmonellose met betrekking tot varken, rund, kip, ei en overige bronnen. *Infectieziekten Bull.* 10, 240-243. In Dutch.
- 25 Proux, K., Jouy, E., Houdayer, C, Protais, J., Dibb-Fuller, M., Boscher, E., Gillard, A., Gracieux, P., Gilbert, F., Beaumont, C, Duchet-Suchaux, M. (2002) Reliable ELISAs showing differences between resistant and susceptible lines in hens orally inoculated com *Salmonella enteritidis*. *Vet. Res.* 33, 23-33.

- Pyrohova, L. V., Starodub, M.F., Artiukh, V.P., Nahaieva, L.I., DobrosoL H.I. (2002) Express diagnostics of bovine leucosis by immune sensor based on surface plasmon resonance. Ukr. Biokhim. Zh. 74, 88-92. In Ukrainian.
- 5 Sachsenweger, O., Lohr, J.E., Kusters, J. (1994) Evaluation of three commercial ELISA test kits for the detection of antibodies against *Salmonella enteritidis*. Tierarztl. Prax. 22, 350-7. In German.
- Skov, M.N., Feld, N.C., Carstensen, B., Madsen, M. (2002) The serologic response to *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in experimentally infected chickens, followed by an indirect lipopolysaccharide enzyme -linked immunosorbent assay and bacteriologic examinations through
- 10 a one-year period. De ave Dis. 46, 265-73.
- Su, X., Low, S., Kwang, J., Chew, V.H.T., Li, S.F.Y. (2001). Piezoelectric quartz crystal based veterinary diagnosis for *Salmonella enteritidis* infection in chicken and egg. Sensors and Actuators B: Chemical 75, 29-35.
- 15 Sunwoo, H.H., Nakano, T., Dixon, W.T., Sim, J. S. (1996) Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Poult. Sci. 75, 342-5.
- Uttenthaler, E., Kosslinger, C. and Drost, S. (1998) Characterization of immobilization methods for African suíno fever virus protein and antibodies
- 20 com a piezoelectric immunosensor. Biosens. Bioelectron. 13, 1279-86.
- Vetcha, S., Wilkins, E., Yates, T.(2002) Detection of hantavirus infection in hemolyzed mouse blood using alkaline phosphatase conjugate. Biosens. Bioelectron. 17, 901-9.
- De Vries, N., Zwaagstra, K.A., Huis in't Veld, J.H., van Knapen, F., van
- 25 Zijderveld, F.G. e Kusters J.G. (1998) Production of monoclonal antibodies specific for the i and 1,2 flagellar antigens of *Salmonella typhimurium* and characterization of their respective epitopes. Appl. Environ. Microbiol. 64, 5033.
- Van Zijderveld, F.G., van Zijderveld- van Bommel, A.M. e Anakotta, J.

(1992) Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. J. Clin. Microbiol. 30, 2560-6.

5 Zweig, N.H. e Campbell, G. (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin. Chem. 39, 561- 77. Erratum in: Clin Chem 1993, 39, 1589.

Referências Exemplo 3

10 Benoit P.W. and D.W. Donahue. 2003. Methods for rapid separation and concentration of bacteria in food that bypass time-consuming cultural enrichment. J. Food Prot. 66(10):1935-1948.

Che Y., Y. Li, and M. Slavik. 2001. Detection of *Campylobacter jejuni* in poultry samples using an enzyme-linked immunoassay coupled com an enzyme electrode. Biosens. Bioelectron 16(9-12):791-797.

15 Christensen B., H. Sommer, H. Rosenquist and N. Neilsen. 2001. Risk assessment on *Campylobacter jejuni* in chicken product. Available Source: http://www.foodrisk.org/risk_assessments.cfm?item1=Campylobacter&item2=All+Commodities&Submit=Submit, June 15, 2004.

20 Coker A.O. 2000. Incidence, trends and sources of Campylobacteriosis in developing countries - An overview, pp. 44-48. In Proceedings of a WHO Consultation of Experts, Copenhagen, Denmark, 21-25 November 2000. Available Source: <http://www.who.int/emcdocuments/zoonoses/whocdscsraph20017c.html>, June 15, 2004.

25 FSAI (Food Safety Authority of Ireland). 2002. Control of Campylobacter species in the food chain. Available source: http://www.fsai.ie/publications/report/Campylobacter_report.pdf, June 15, 2004.

Lake, R., A. Hudson, P. Cressey and G. Nortje. 2003. Risk Profile: *Campylobacter jejuni* coli in poultry (whole and pieces). Client Report FW0109. Christchurch: ESR. (Institute of Environmental Science & Research

Limited). Available source: <http://www.nzfsa.govt.nz/science-technology/risk/profiles/Campylobacter.pdf>, June 15, 2004.

Stern, N.J. and J.E. Line. 2000. *Campylobacter*, pp. 1040-1056. Em Lund B.M., T.C. Baird-Parker e G.W.Gould (eds.). *The Microbiological Safety and Quality of Food Volume II*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland.

Tauxe R. V. 2000. Major risk factors for human *Campylobacteriosis* - An overview, pp. 65-66. In *Proceedings of a WHO Consultation of Experts*, Copenhagen, Denmark, 21-25 November 2000. Available Source: <http://www.who.int/emc-documents/zoonoses/whocdscsraph20017c.html>,

June 15, 2004.

Waller D. F. e S.A. Ogata. 2000. Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9): 4115-4118.

Yu L.S., J. Uknalis, e S.I. Tu. 2001. Immunomagnetic separation methods for the isolation of *Campylobacter jejuni* from ground poultry meats. *J. Immunol. Methods.* 256(1-2): 11-18.

Referências Exemplo 4

Salin pork: Final Report of Salmonella in Pork (SALINPORK) Preharvest and harvest control options based on epidemiology, diagnostic and economic research (2000) EU project FAIR1 CT95-0400, (Lo Fo Wong, D.M.A. & Hald, T, eds), Copenhagen, Denmark, pp. 251.

European Commission - Health & Consumer Protection Directorate-General (2004) Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuffs, food and man in the European Union and Norway in 2002, Part 1, SANCO/29/2004, pp. 32

Referências Exemplos 6, 7 e 8

Lindberg, A A. Bacterial surface carbohydrates and bacteriophage adsorption. Em: Sutherland I E., editor; Sutherland I E., editor. *Surface carbohydrates of the prokaryotic cells*. London, United Kingdom: Academic Press; 1977. pp.

289-356.

Lindberg AA, Holme T. 1969. Influence of O side chains on the attachment of the Felix O-1 bacteriophage to Salmonella bacteria. *J Bacteriol.* 99(2):513-9.

5 Hirsh, Dwight C. e Martin, Lori D. 1983. Detection of Salmonella spp. in milk by using Felix-O1 bacteriophage and high-pressure liquid chromatography. *Appl Environ. Microbiol.* 46(5): 1243-5.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para imobilizar um polissacarídeo sobre um carreador, caracterizado pelo fato de compreender contatar o citado polissacarídeo com um agente oxidante e um polímero compreendendo pelo menos dois grupos amina e/ou amida para obter um complexo de polissacarídeo-polímero e copular o citado complexo de polissacarídeo-polímero com o citado carreador.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado polímero é proteína.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o citado polissacarídeo é derivado de uma bactéria gram-negativa.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, caracterizado pelo fato de que o citado polissacarídeo é derivado de uma *Enterobacteriaceae*.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o citado polissacarídeo é derivado de uma (sub)espécie de *Salmonella*.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o citado polissacarídeo é um lipopolissacarídeo.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a citada proteína é hemoglobina ou mioglobina.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o citado agente oxidante é m-periodato (de sódio).

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de adicionalmente compreender ativar a superfície

de citado carreador.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o citado carreador compreende uma superfície de vidro revestida com ouro.

5 11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o citado carreador é modificado com um revestimento compreendendo um doador de grupo carboxila, preferivelmente uma camada de dextrano carboximetilado.

10 12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o citado doador de grupo carboxila e/ou a camada de dextrano é ativado(a) com cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimida, N-hidróxi-succinimida e carboidrazida.

15 13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos dois polissacarídeos diferentes.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que o citado carreador é um chip de biossensor.

20 15. Carreador, caracterizado pelo fato de ser obtido pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14.

16. Carreador, caracterizado pelo fato de compreender um complexo de polissacarídeo-polímero imobilizado sobre sua superfície.

25 17. Carreador de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de compreender um revestimento compreendendo um doador de grupo carboxila, preferivelmente um dextrano carboximetilado, ligado em um polissacarídeo compreendendo um antígeno, no qual o citado doador de grupo carboxila e o citado polissacarídeo estão ligados um no outro via um polímero compreendendo pelo menos dois grupos amina e/ou amida, no qual pelo menos o citado polissacarídeo é ligado no citado polímero via um diol vicinal

oxidado por periodato sobre o citado polissacarídeo e um grupo amina e/ou amida sobre o citado polímero.

18. Carreador de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de ser uma microesfera ou um glóbulo.

5 19. Carreador de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a citada microesfera ou o citado glóbulo é uma microesfera ou um glóbulo de poliestireno.

20. Carreador de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-19, caracterizado pelo fato de ser codificado.

10 21. Carreador de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de ser codificado pela presença de certo marcador.

22. Carreador de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o citado marcador compreende uma cor.

15 23. Carreador de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a citada cor é uma cor fluorescente ou fosforescente.

24. Coleção de microesferas ou de glóbulos, caracterizada pelo fato de compreender pelo menos duas microesferas ou dois glóbulos diferentemente codificadas(os) de acordo com qualquer uma das reivindicações 20-23.

20 25. Coleção de microesferas ou de glóbulos de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que cada uma das(os) citadas(os) microesferas ou glóbulos diferentemente codificadas(os) compreende um polissacarídeo que compreende um antígeno diferente.

25 26. Biossensor, caracterizado pelo fato de compreender um carreador como definido na reivindicação 15 ou 23.

27. Sistema de detecção por Ressonância de Plasmon de Superfície, caracterizado pelo fato de compreender um biossensor de acordo com a reivindicação 26.

28. Método para determinar a presença de um anticorpo

direcionado para um antígeno de uma bactéria gram-negativa em uma amostra, caracterizado pelo fato de compreender contatar a citada amostra com um carreador como definido em qualquer uma das reivindicações 15 ou 23 ou com um biossensor como definido na reivindicação 26 e determinar se o carreador tem ligado algum anticorpo.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a citada amostra é sangue, material líquido derivado de sangue, fluidos derivados de tecido, tais como líquido gotejado de carne, leite, ovos, fluidos de um olho, saliva ou fezes.

30. Método para determinar a presença de uma bactéria gram-negativa em uma amostra, caracterizado pelo fato de compreender contatar a citada amostra com uma quantidade predeterminada de anticorpos direcionados contra um antígeno de citada bactéria e determinar a quantidade de anticorpos não ligados na citada bactéria com um carreador como definido na reivindicação 15 ou 23 ou com um biossensor como definido na reivindicação 26.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 30, caracterizado pelo fato de que a ligação em citado carreador ou citado biossensor é determinada por Ressonância de Plasmon de Superfície.

32. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 28 a 31, caracterizado pelo fato de que a citada amostra é obtida de um humano ou de um animal.

33. Método para determinar a presença de uma bactéria gram-negativa em uma amostra, caracterizado pelo fato de compreender:

- contatar a citada amostra com bacteriófagos específicos para bactérias alvo e permitir que os bacteriófagos infectem a citada amostra,
- remover os bacteriófagos não-ligados e/ou não-invasores resultando em uma amostra infectada por bacteriófago,
- contatar a citada amostra infectada por bacteriófago com

um organismo indicador suscetível aos bacteriófagos usados,

- incubar durante pelo menos um ciclo de multiplicação de bacteriófago,

- recuperar os bacteriófagos para obter uma amostra contendo bacteriófago,

- analisar a citada amostra contendo bacteriófago com um carreador como definido na reivindicação 15 ou 23 ou com um biossensor como definido na reivindicação 26.

34. Método de acordo com a reivindicações 33, caracterizado pelo fato de que a citada amostra é obtida de um humano, uma planta ou um animal.

35. Método de acordo com a reivindicação 33 e 34, caracterizado pelo fato de que o citado bacteriófago compreende um bacteriófago da figura 22a, 22b e/ou 22c.

36. Carreador de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-23, caracterizado pelo fato de compreender um bacteriófago da figura 22a, 22b e/ou 22c.

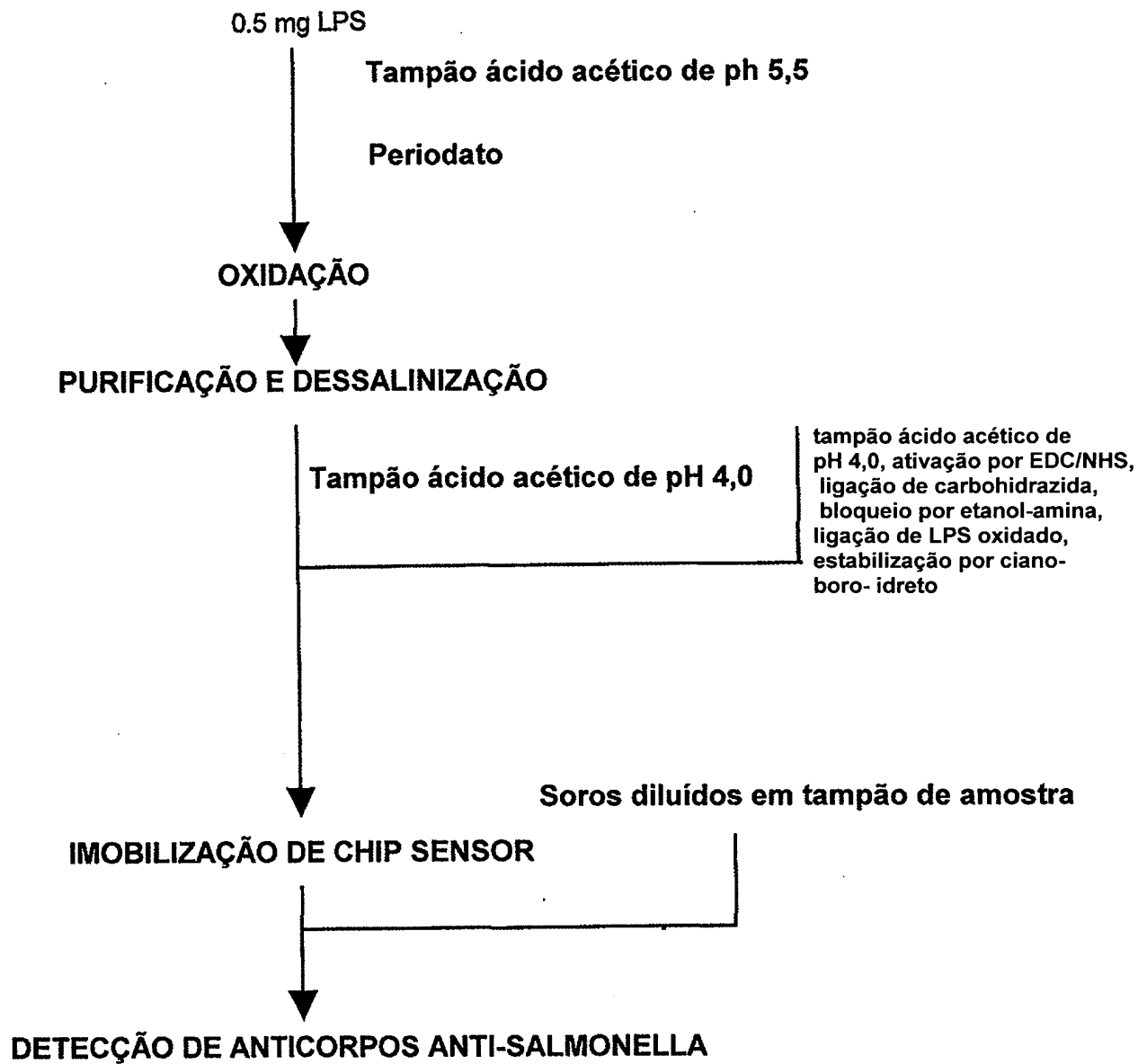


Fig. 1

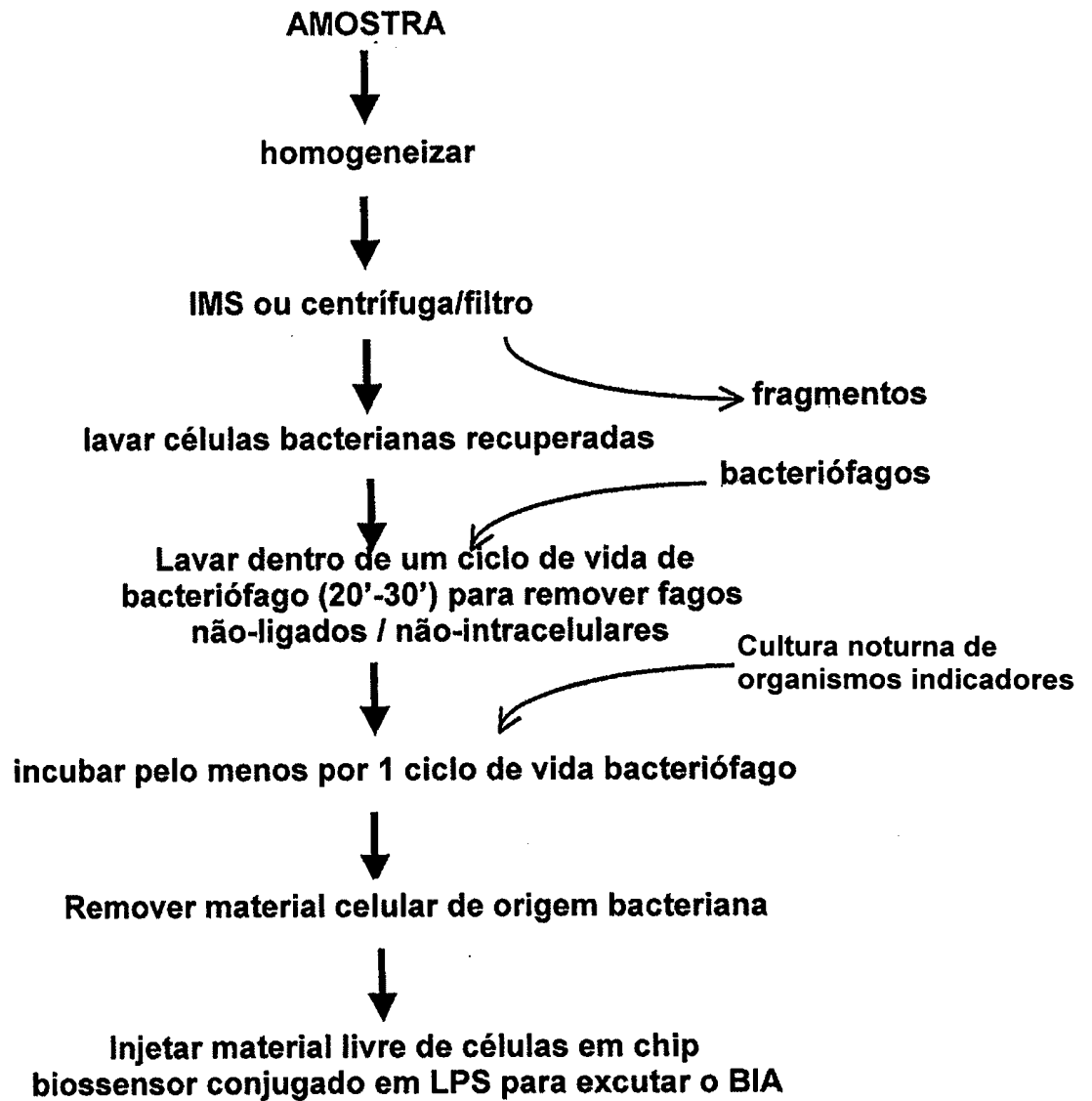


Fig. 2

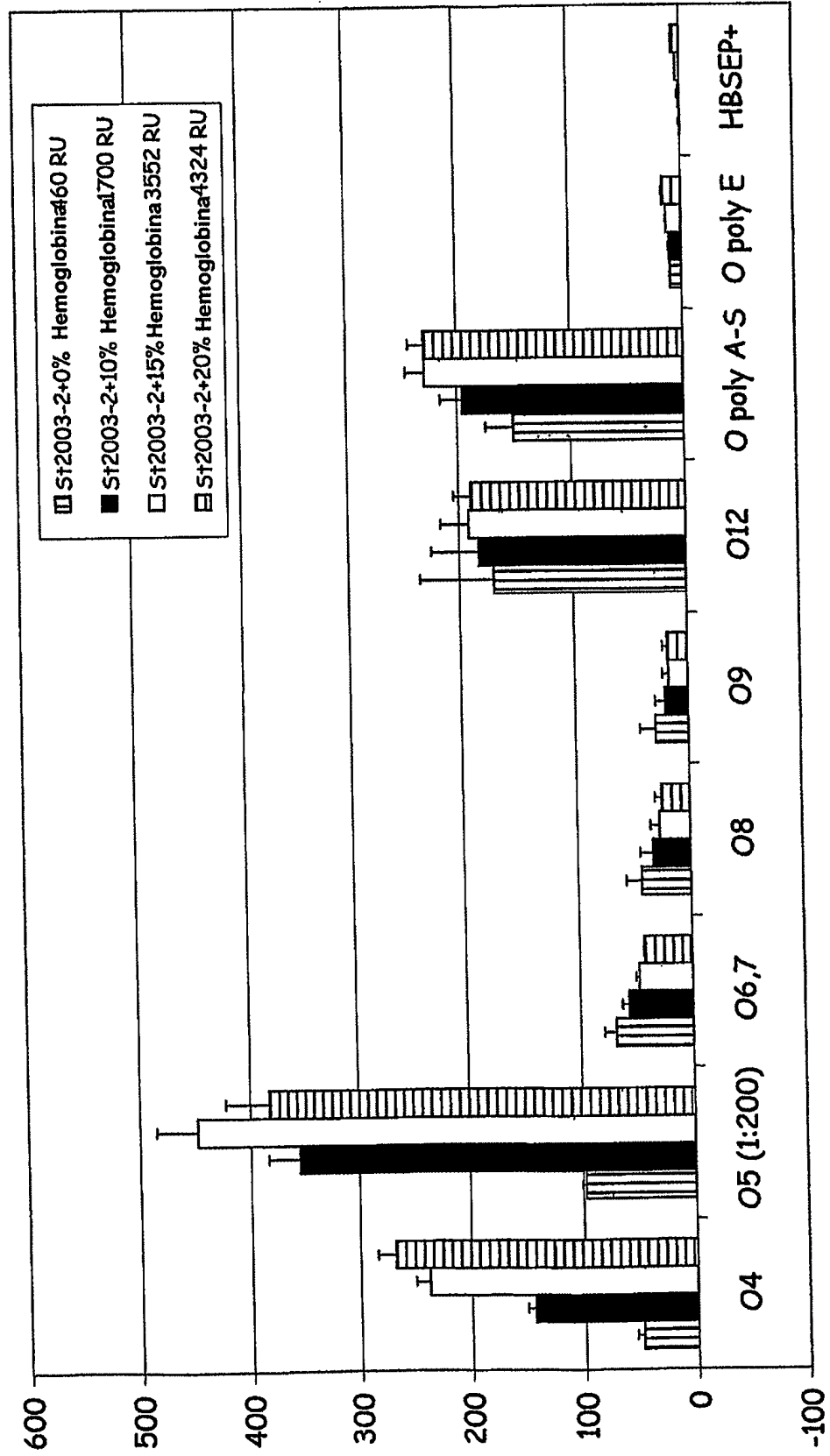


Fig. 3

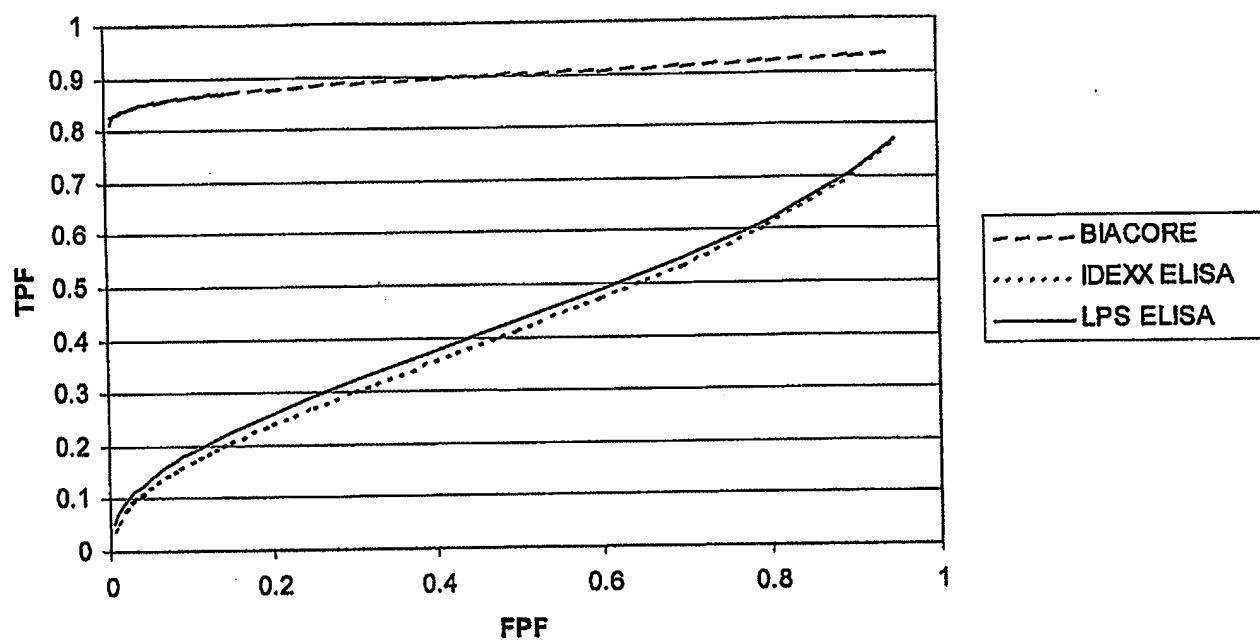


Fig. 4

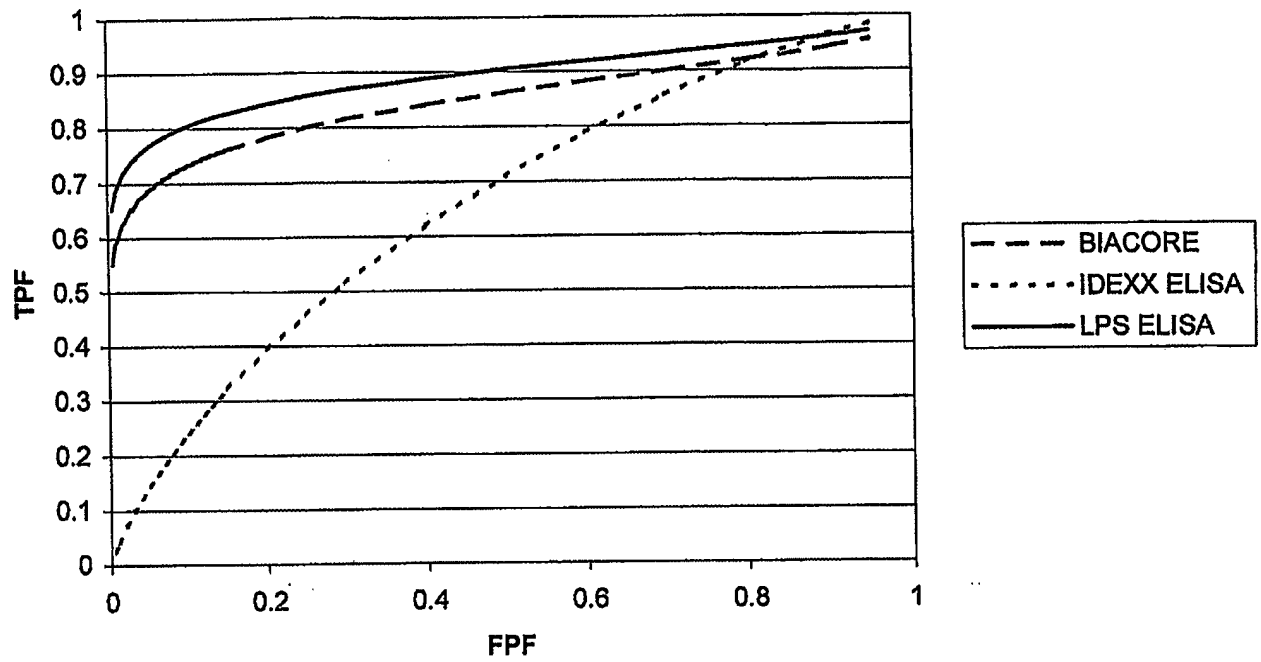


Fig. 5

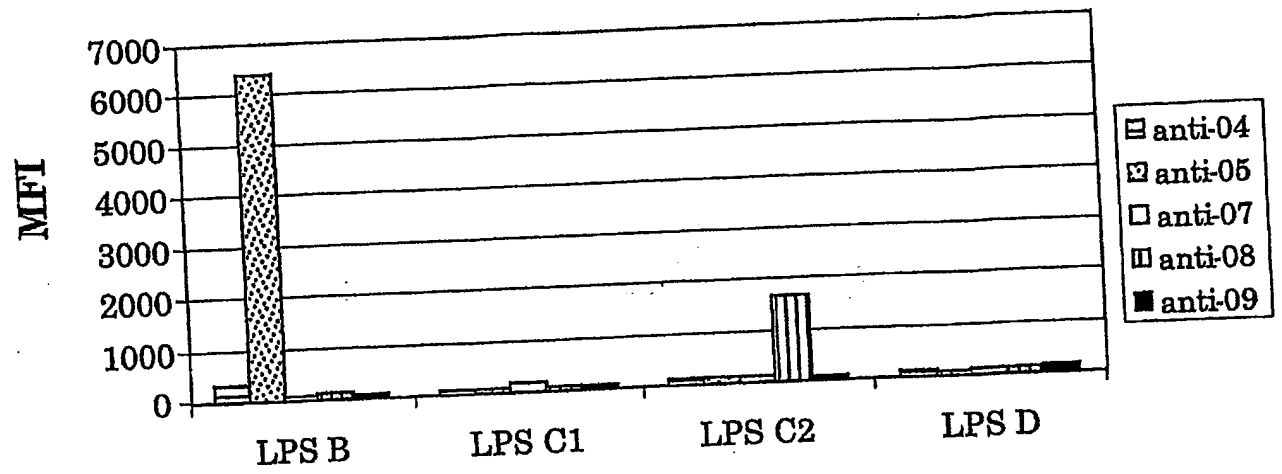


Fig. 6

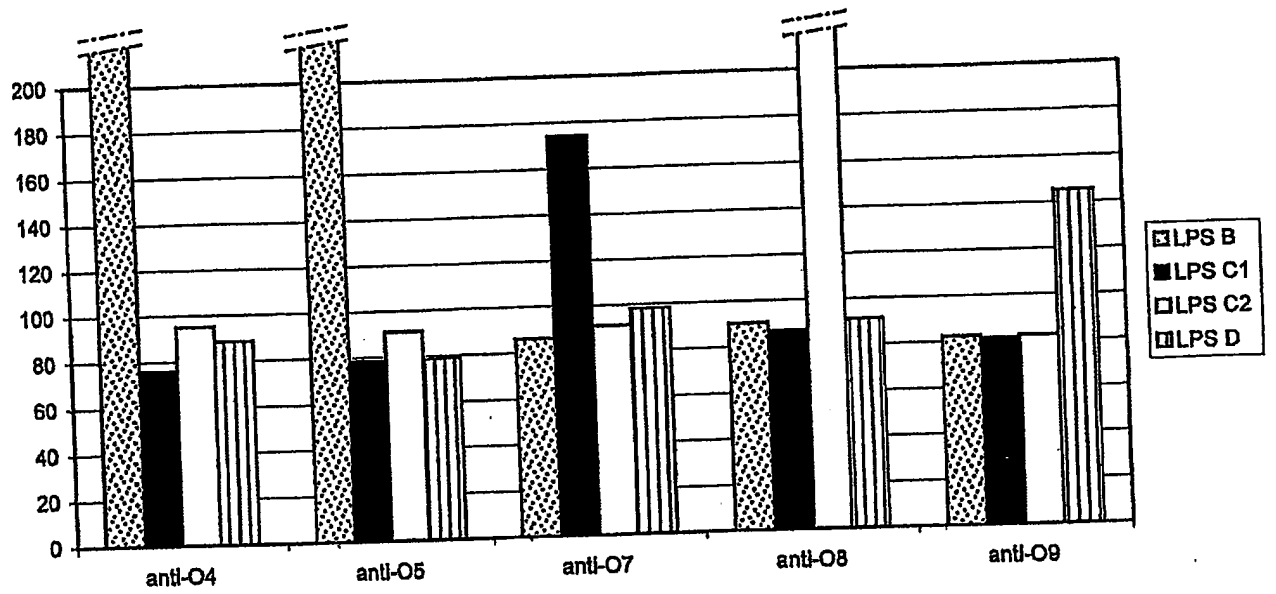


Fig. 7

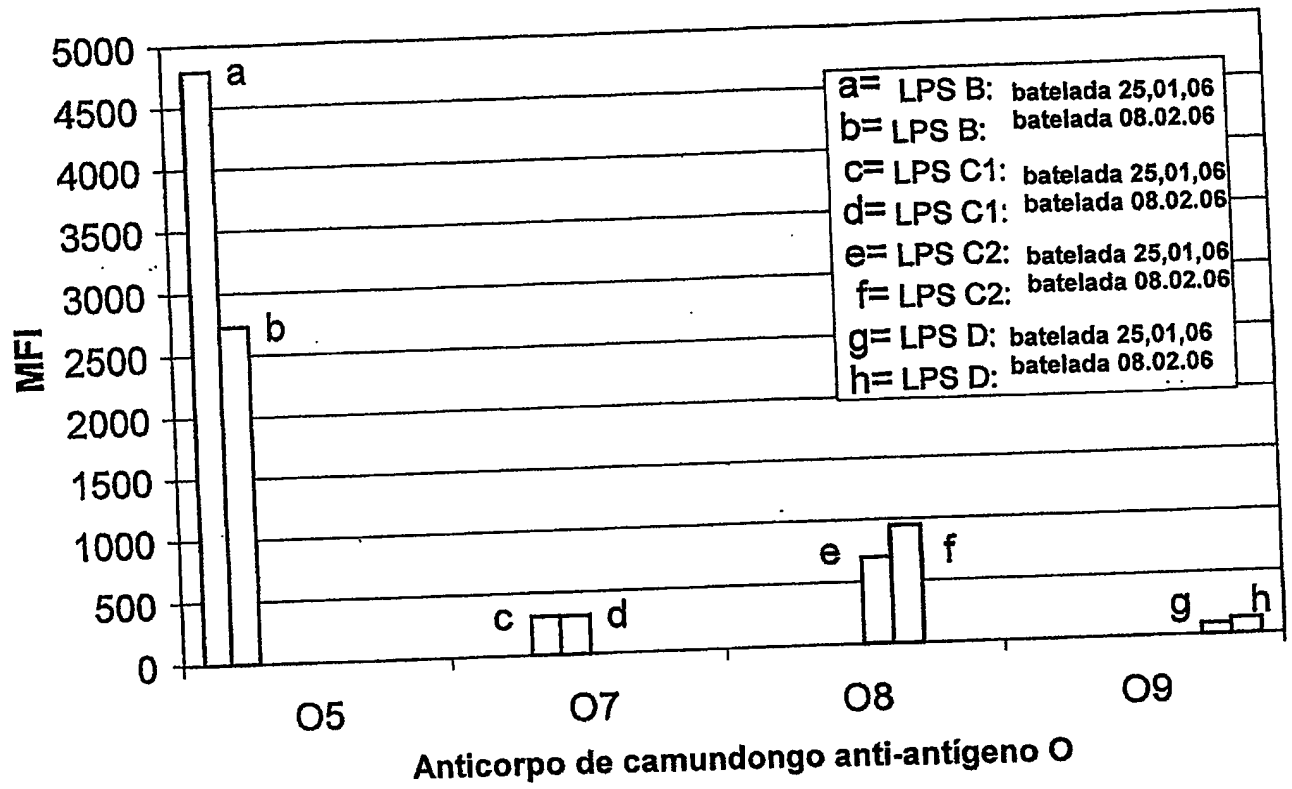


Fig. 8

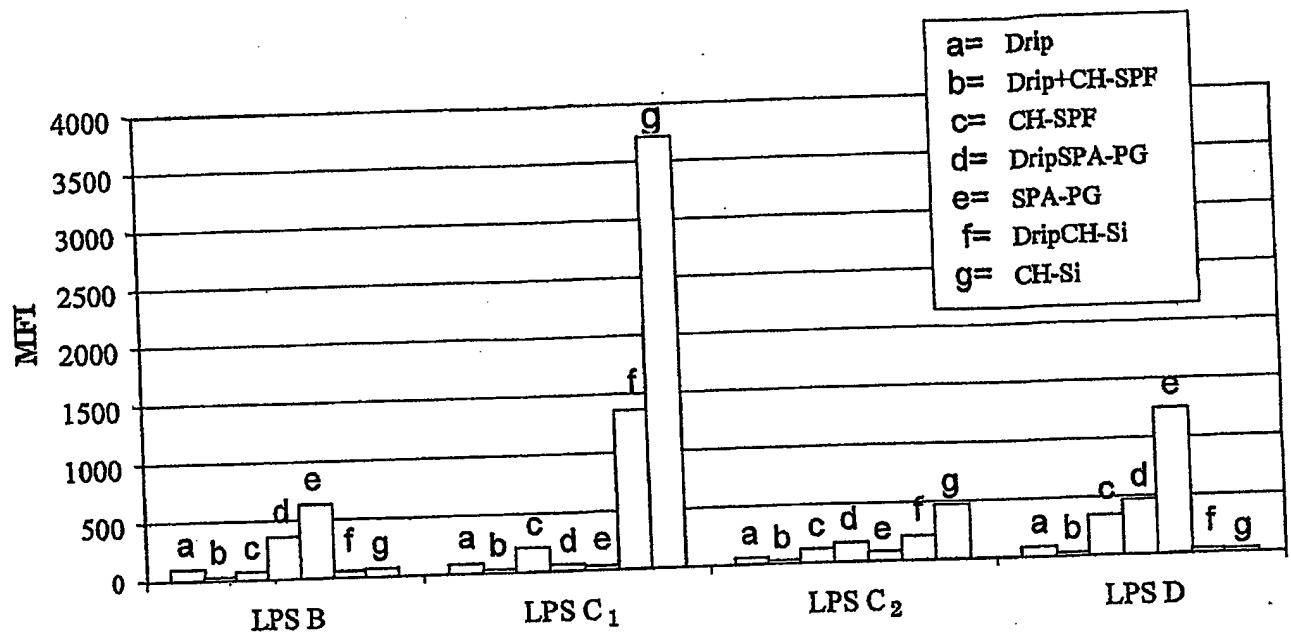


Fig. 9

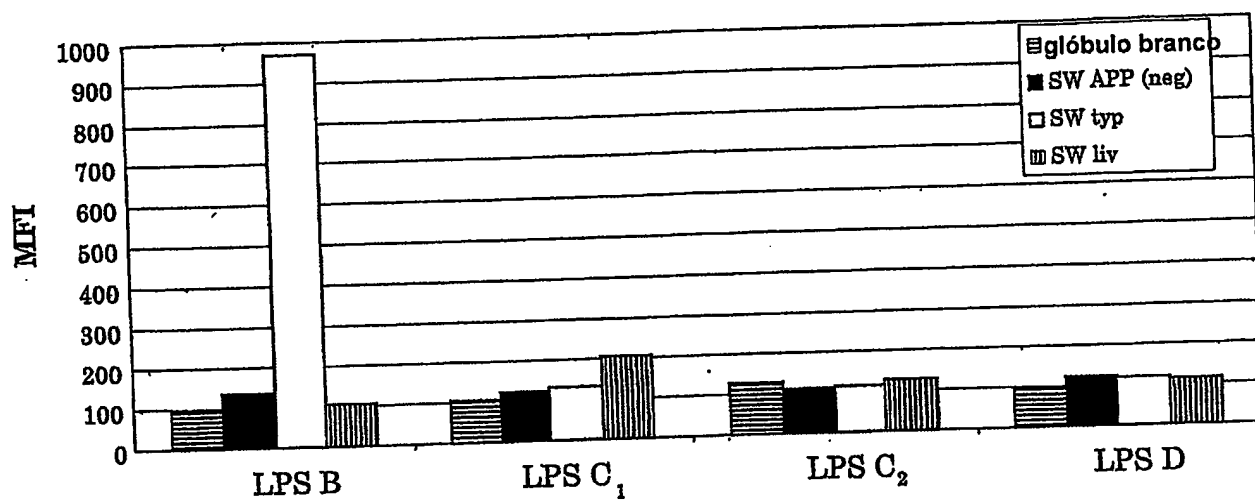


Fig. 10

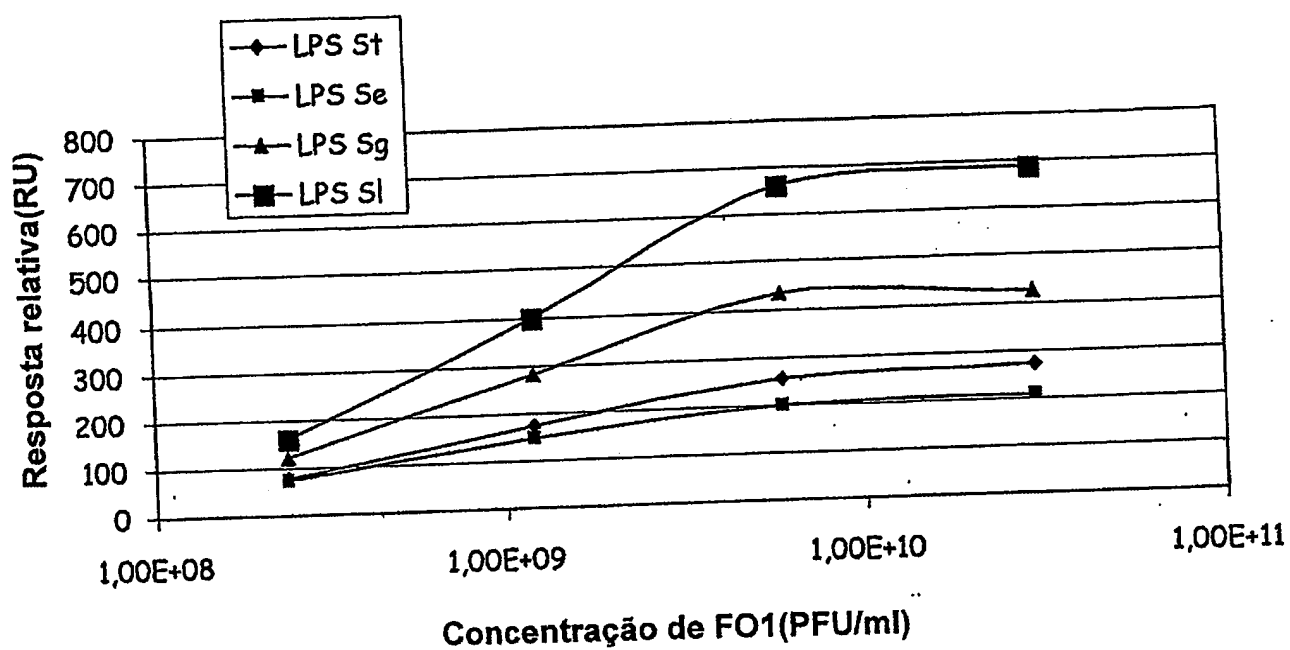


Fig. 11

Ligação de FO1 após incubação de Salmonella
determinada sobre LPS-St: 2420 RU

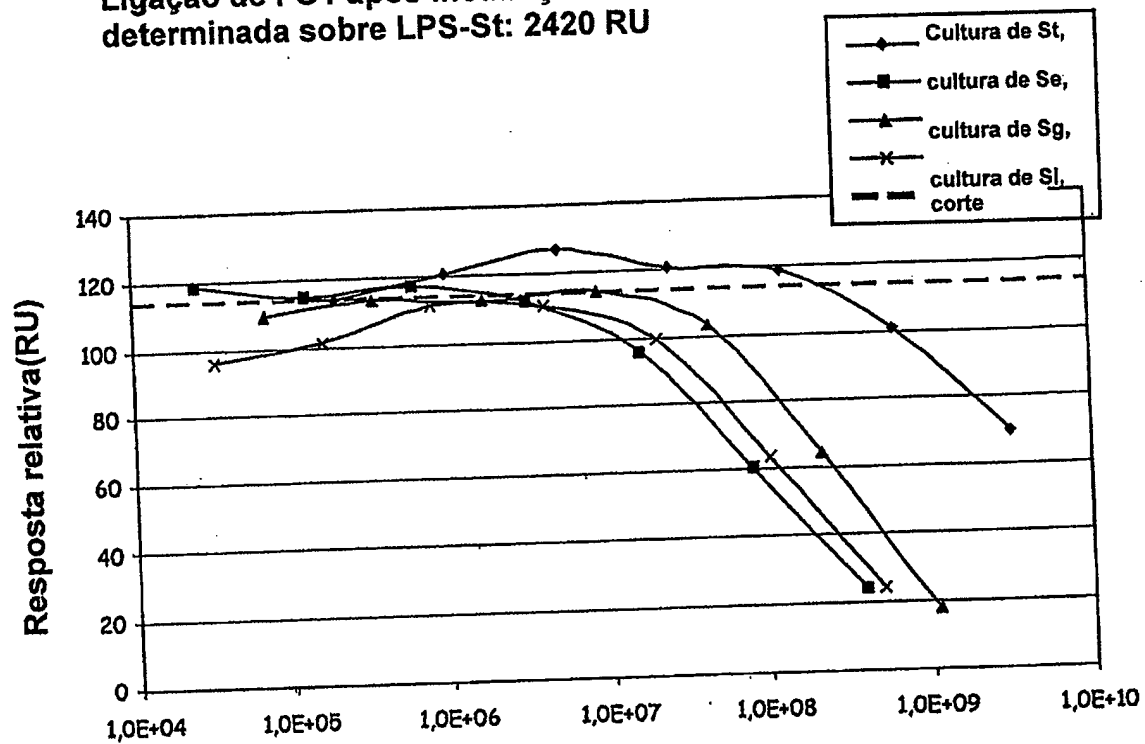


Fig. 12

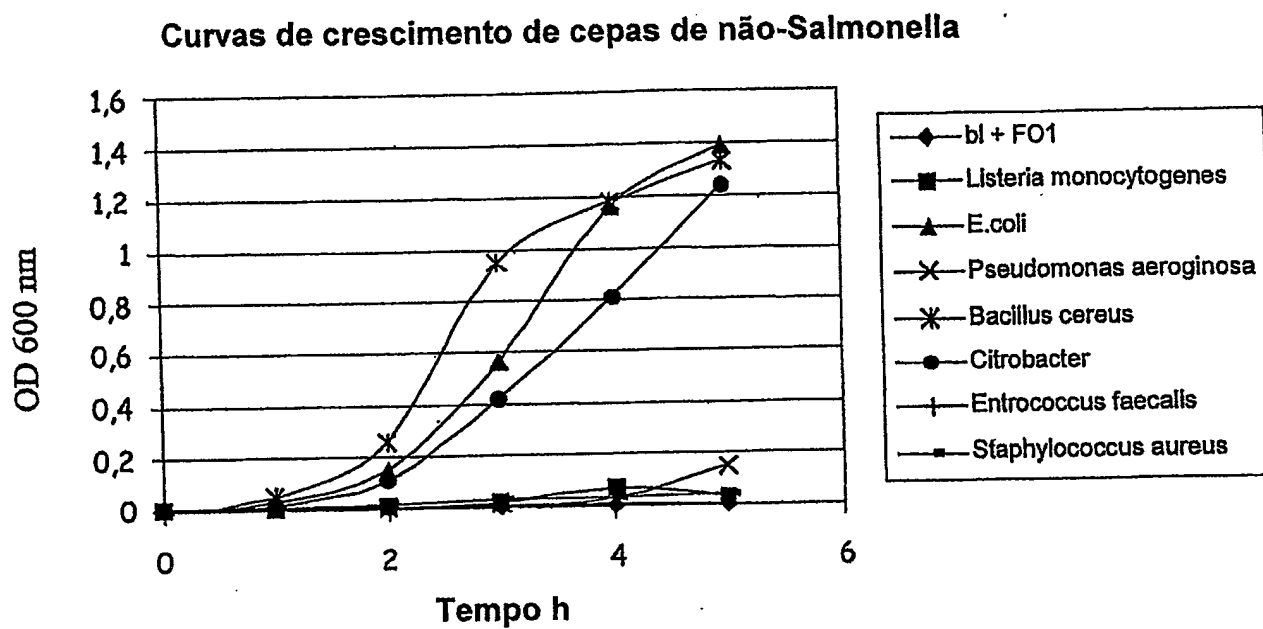


Fig. 13

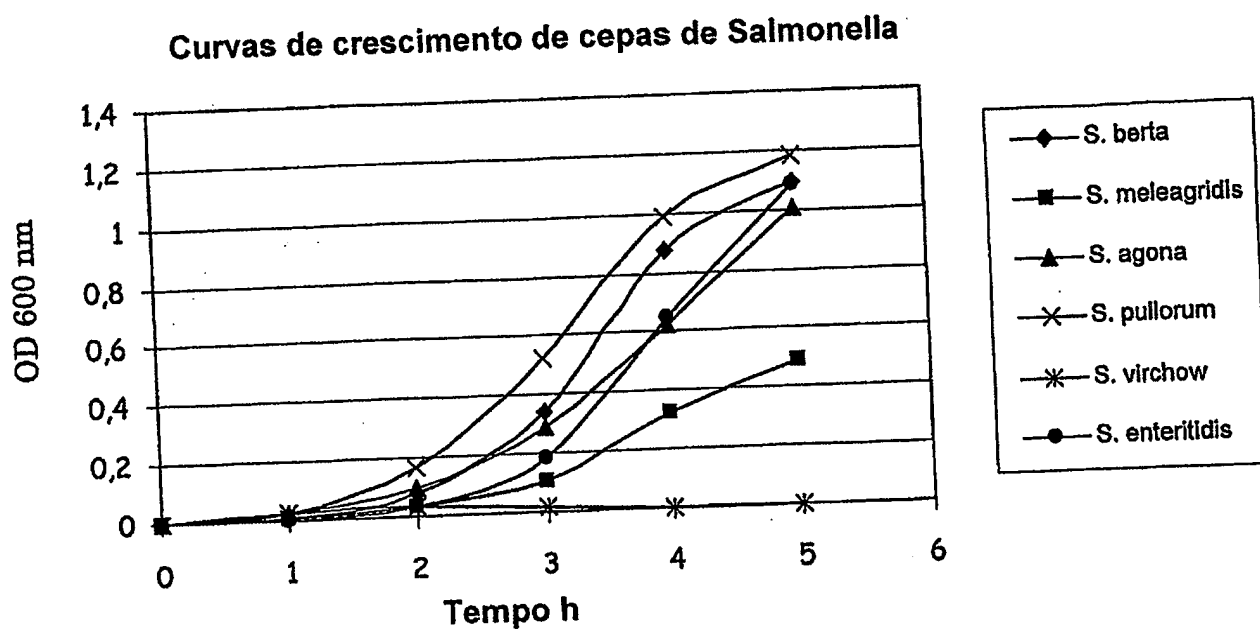


Fig. 14

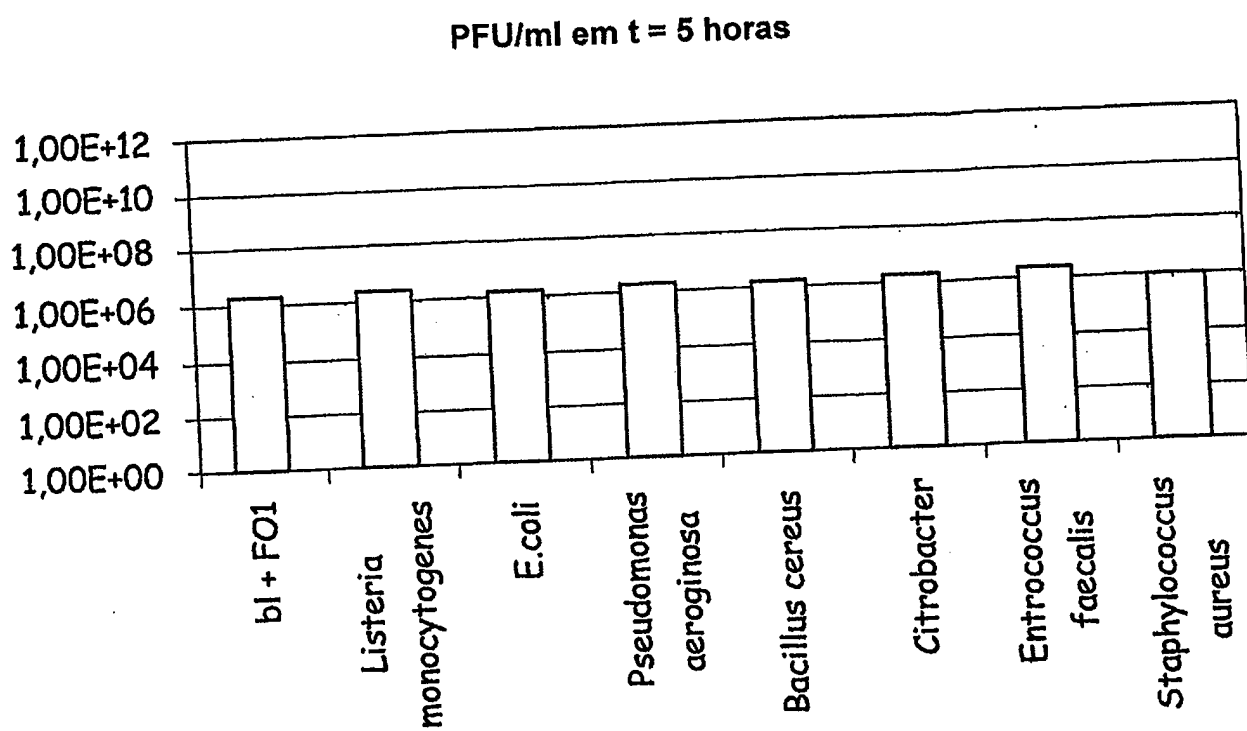


Fig. 15

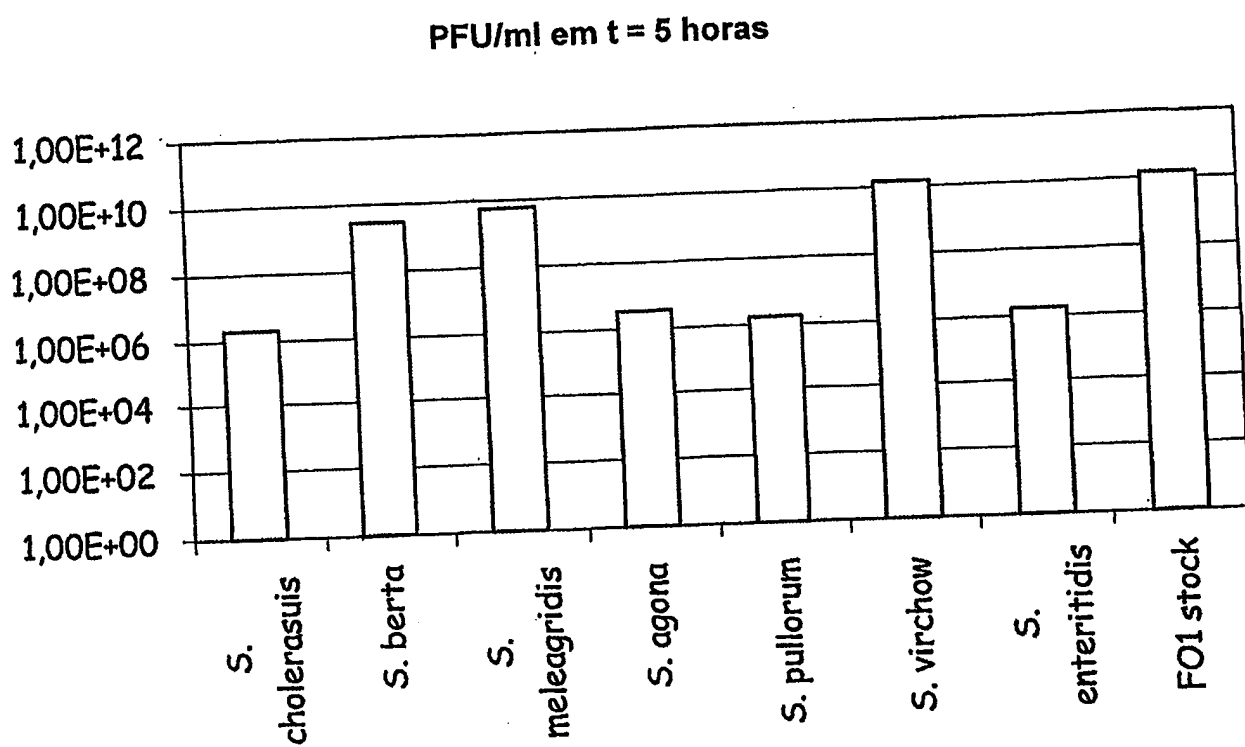


Fig. 16

Ligação de FO1 "uit Salmonella kweken op St"2420 RU

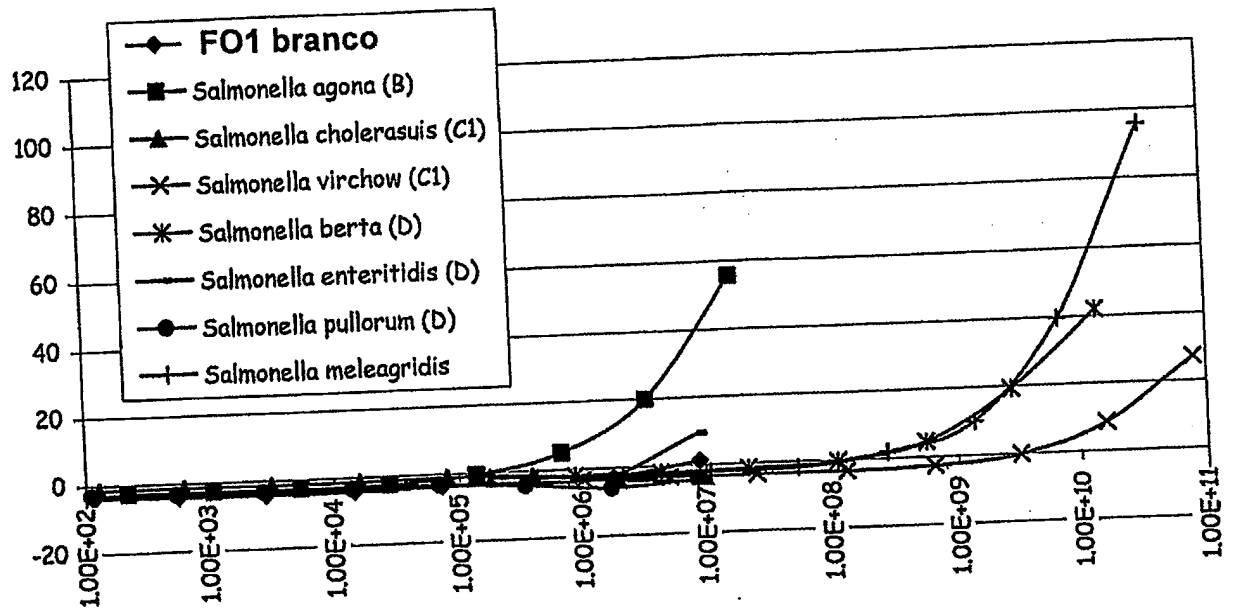


Fig. 17

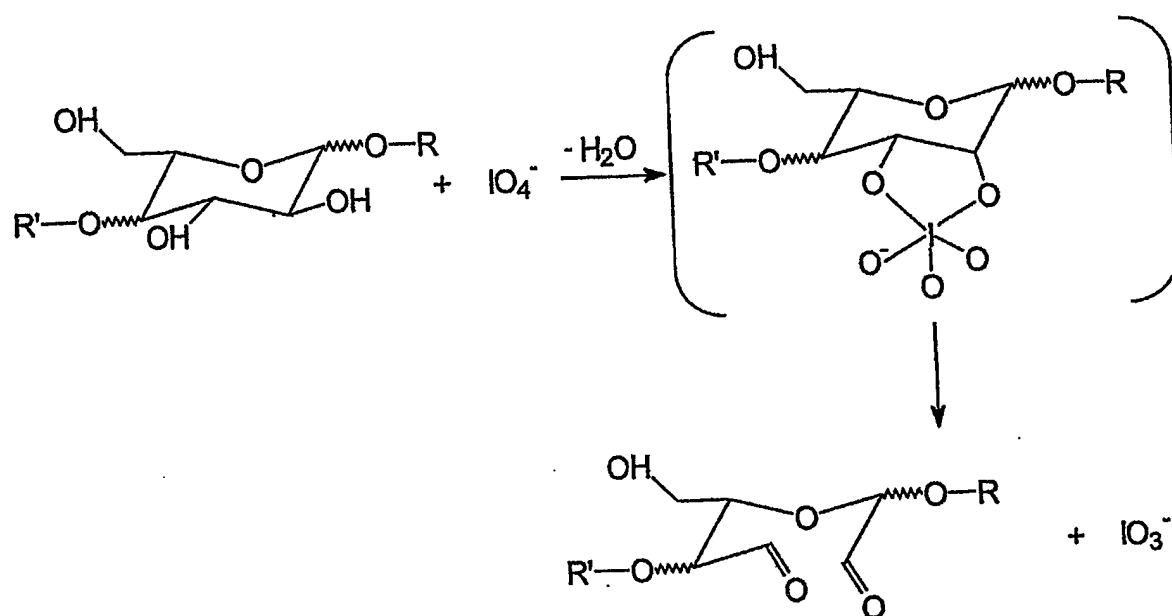


Fig. 18

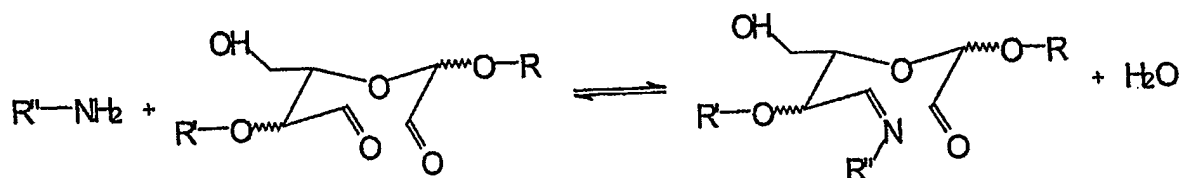


Fig. 19

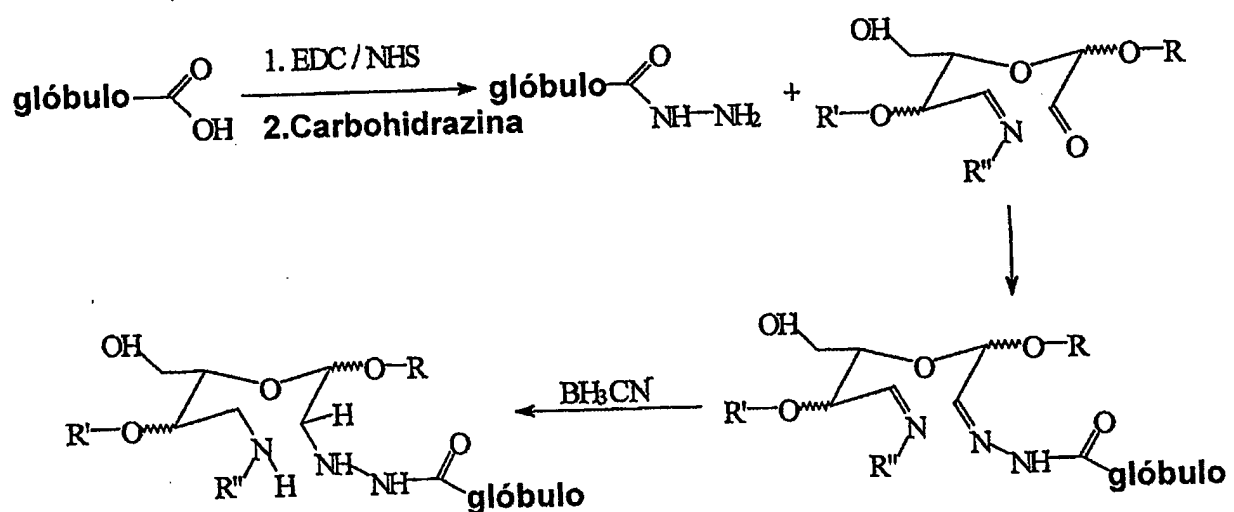


Fig. 20

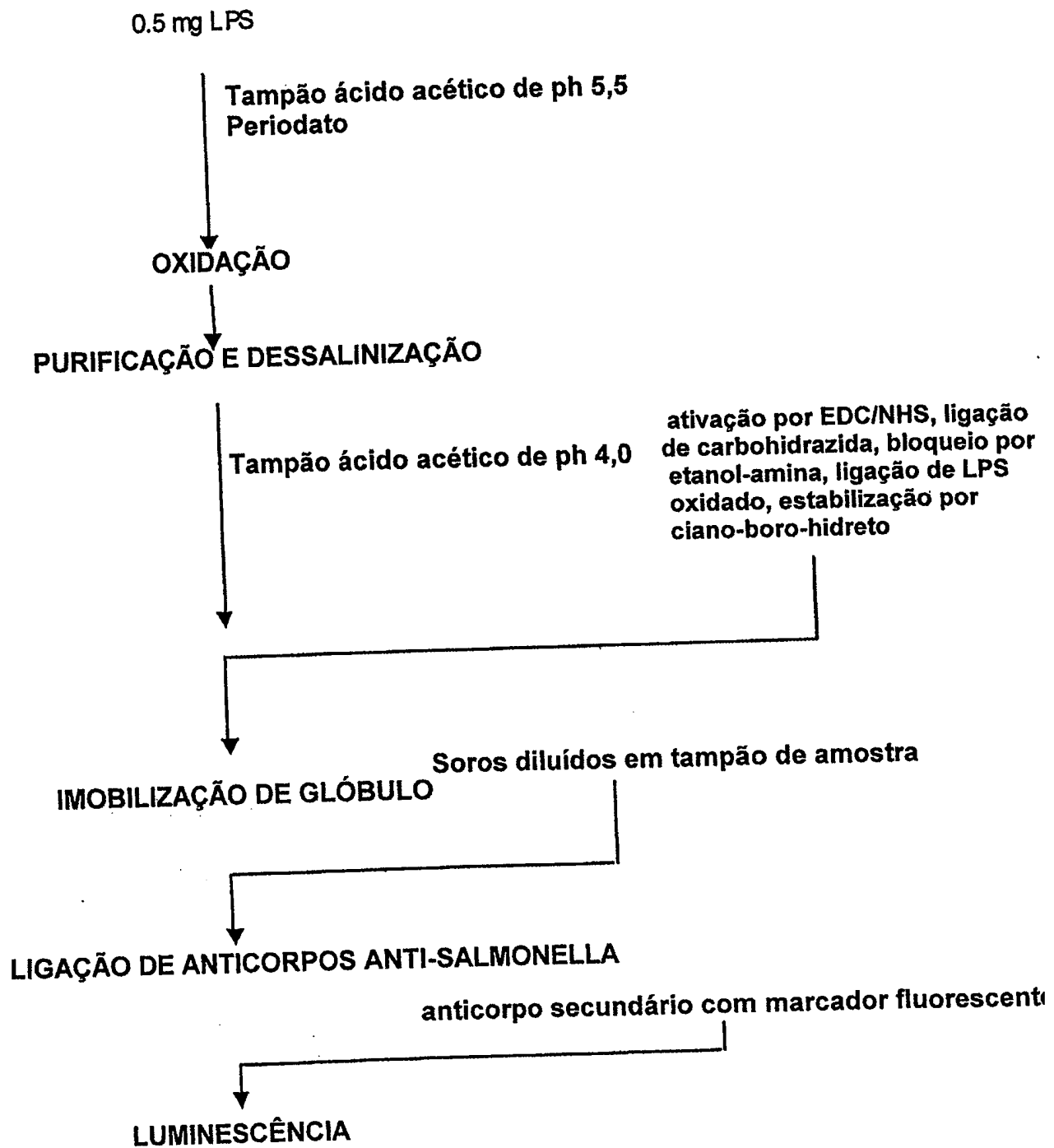


Fig. 21

NTCC12669, NTCC12670, NTCC12671, NTCC12672, NTCC12673,
 NTCC12674, NTCC12675, NTCC12676, NTCC12677, NTCC12678,
 NTCC12679, NTCC12680, NTCC12681, NTCC12682, NTCC12683,
 NTCC12684

Fig. 22a

A005, A006, A020, A500, A502, A511, A118, A620, A640, B012, B021,
 B024, B025, B035, B051, B053, B054, B055, B056, B101, B110, B545,
 B604, B653, C707, D441, HSO47, H10G, H8/73, H19, H21, H43, H46,
 H107, H108, H110, H163/84, H312, H340, H387, H391/73, H684/74,
 H924A, PSA, U153, fMLUP5, (syn= P35), 00241, 00611, 02971A, 02971C,
 5/476, 5/911, 5/939, 5/11302, 5/11605, 5/11704, 184, 575, 633, 699/694,
 744, 900, 1090, 1317, 1444, 1652, 1806, 1807, 1921/959, 1921/11367,
 1921/11500, 1921/11566, 1921/12460, 1921/12582, 1967, 2389, 2425, 2671,
 2685, 3274, 3550, 3551, 3552, 4276, 4277, 4292, 4477, 5337, 5348/11363,
 5348/11646, 5348/12430, 5348/12434, 10072, 11355C, 11711A, 12029,
 12981, 13441, 90666, 90816, 93253, 907515, 910716

Fig. 22b

b, Beccles, CT, d, Dundee, f, Fels 2, GI, GIII, GVI, GVIII, k, K, i, j, L,
 O1, (syn= O-1), (syn= O1), (syn= O-I), (syn= 7), O2, O3, P3, P9a, P10,
 Sab3, Sab5, San15, San17, SI, Taunton, Vi1, (syn= Vi1), 9

Fig. 22c

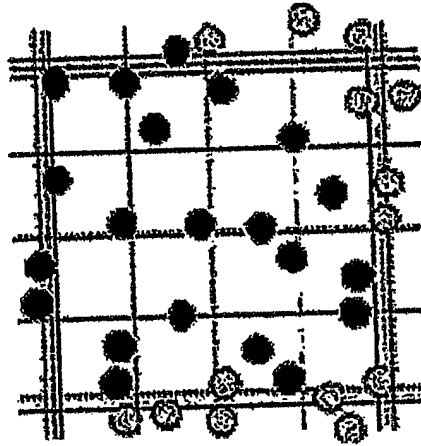


FIG. 6

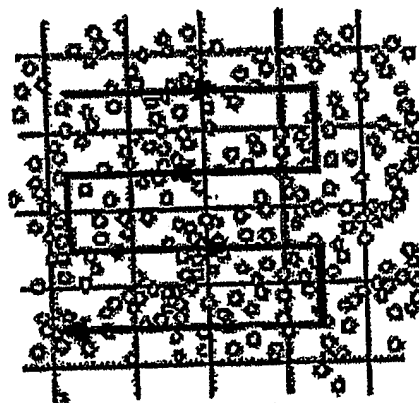


FIG. 6.1

Fig. 23

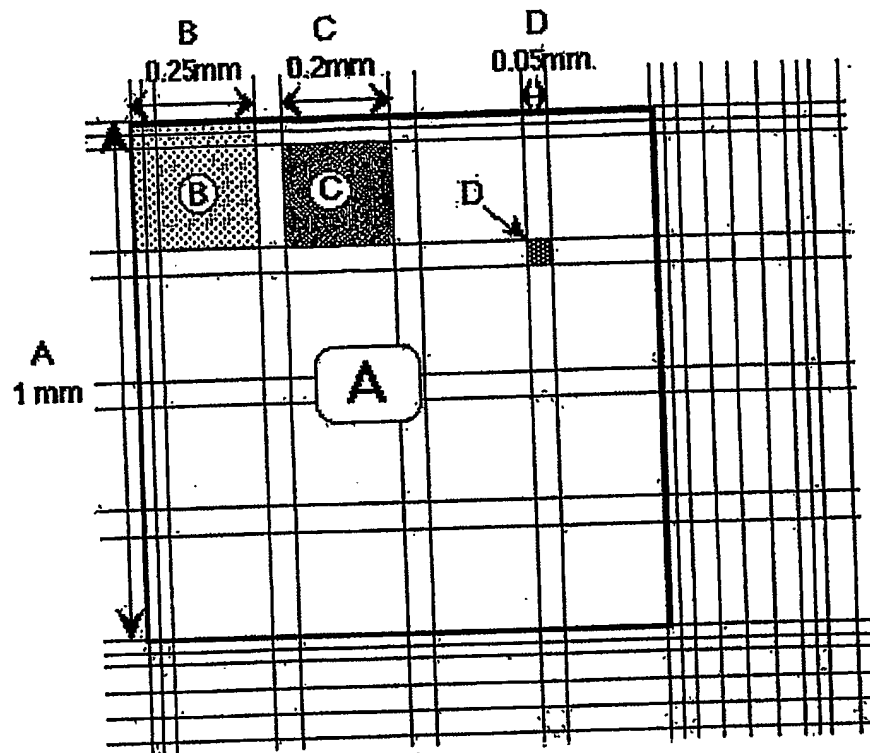


Fig.24

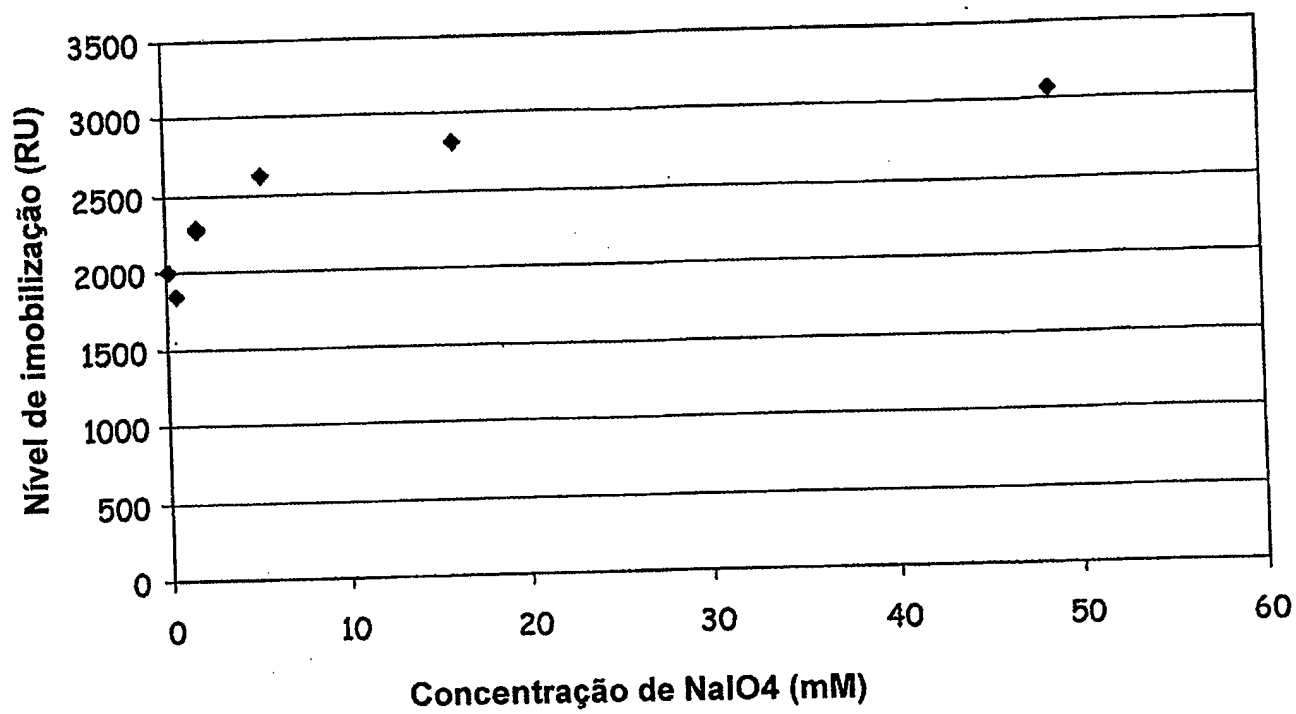


Fig. 25

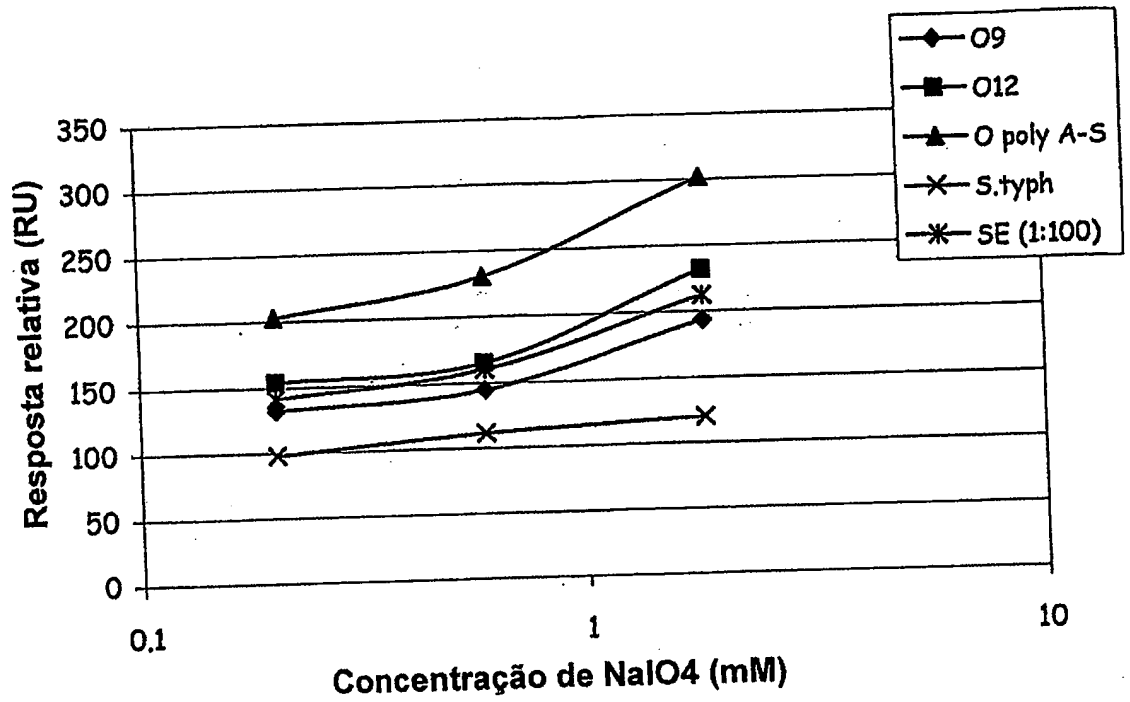


Fig. 26

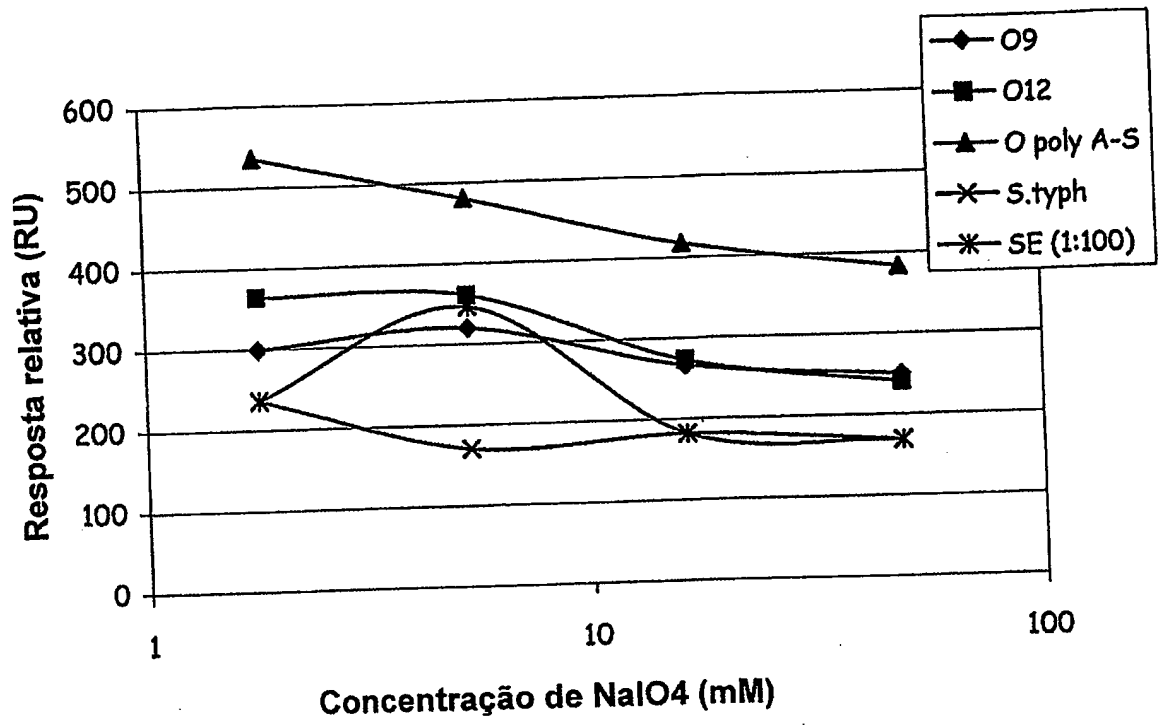


Fig. 27

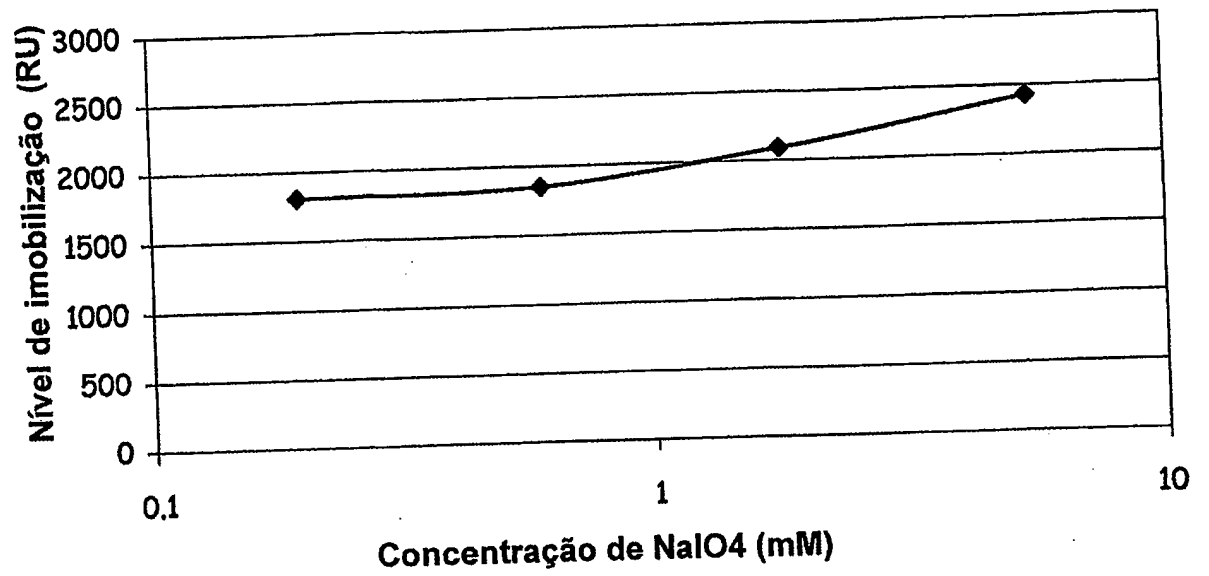


Fig. 28

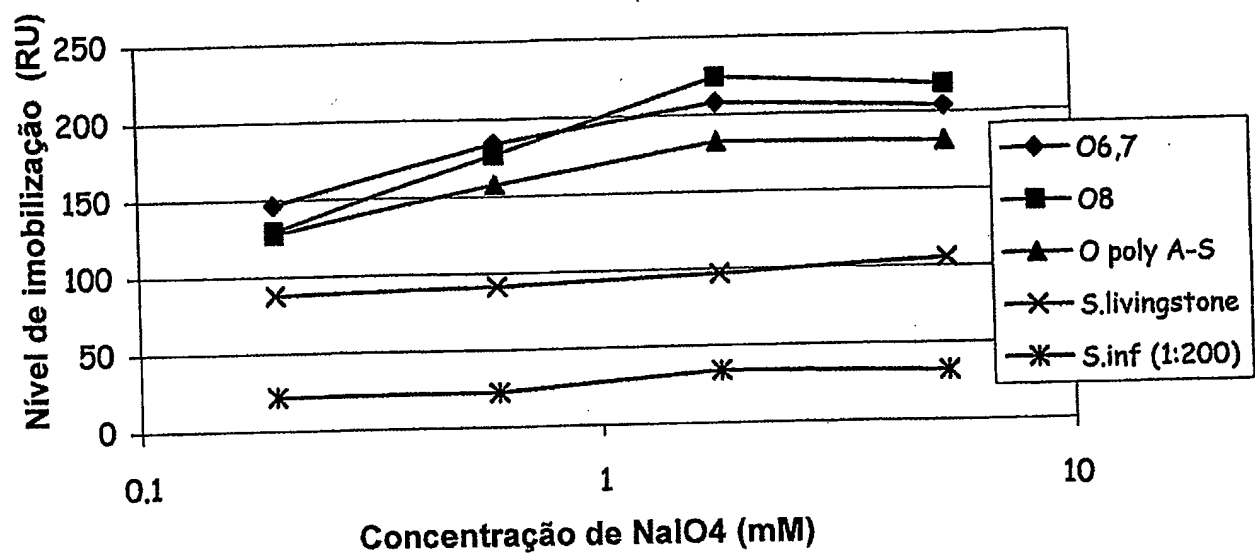


Fig. 29

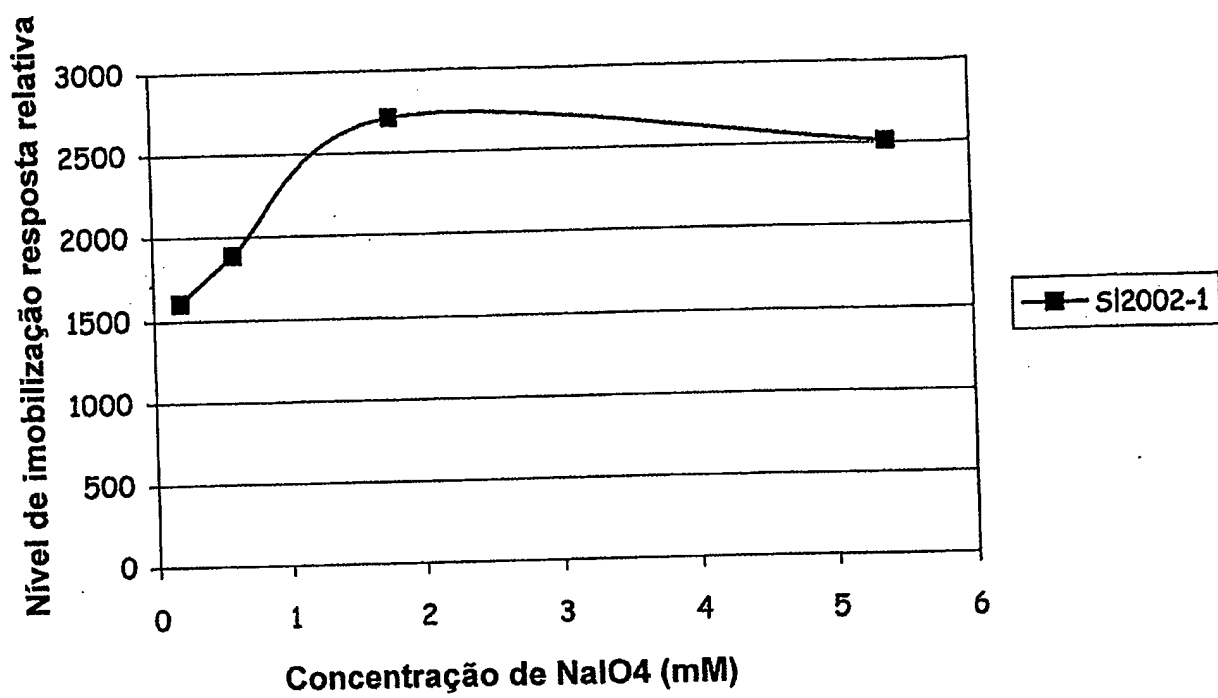


Fig. 30

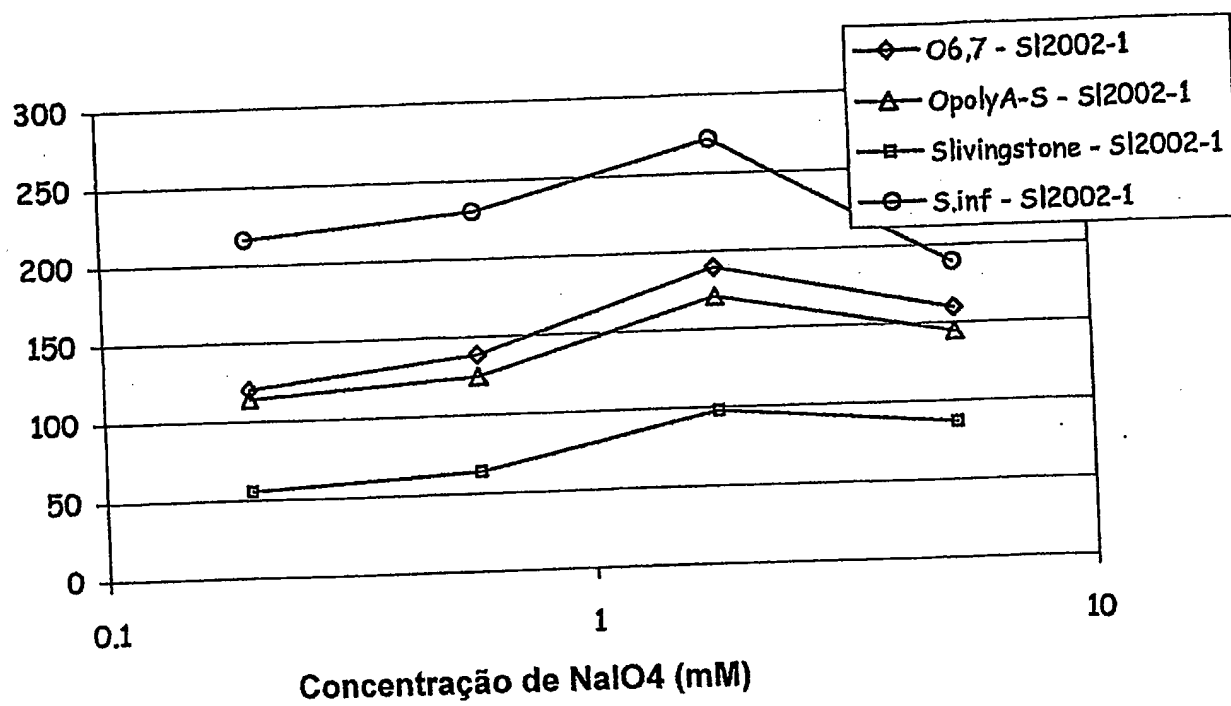


Fig. 31

Folha de qualidade de extração de LPS						
Cepa:	Salmonella			Inoculação data/hora		
Data::				colheita data/hora		
Batelata:				tempo de incubação		hora
quantidade de BHla						
Coleta de células + extração:						
peso de cultura centrifugada (g)			Extração TCA			
tubo #	massa de tubo vazio	massa de tubo + pelota	massa de células (m)	volume x milli Q	volume x TCA	
tubo						
tubo						
tubo						
tubo						
tubo						
		Massa total de células		+		
Determinação de x		$X = m \cdot 5$				
Molaridade y TCA		$Y =$				
tempo de incubação TCA				horas		
precipitação em etanol:						
ajuste de ph		>65?	Sim/não	Max.pH		
		pH inicial				
		pH final				
Volume de sobrenadante / erlenmeyer (v)				ml		
Volume de etanol absoluto:		$E = 2 \cdot v$		ml		
Diálise:						
Volume de milli Q		$Z = 01 \cdot x$		ml		
Liofilização:						
		Massa de tubo vazio	massa de tubo + LPS	massa LPS		
Rendimento de LPS:					g	
recuperação de LPS		massa de LPS/massa total de células * 100%				%
OBSERVAÇÕES:						

FIG.32

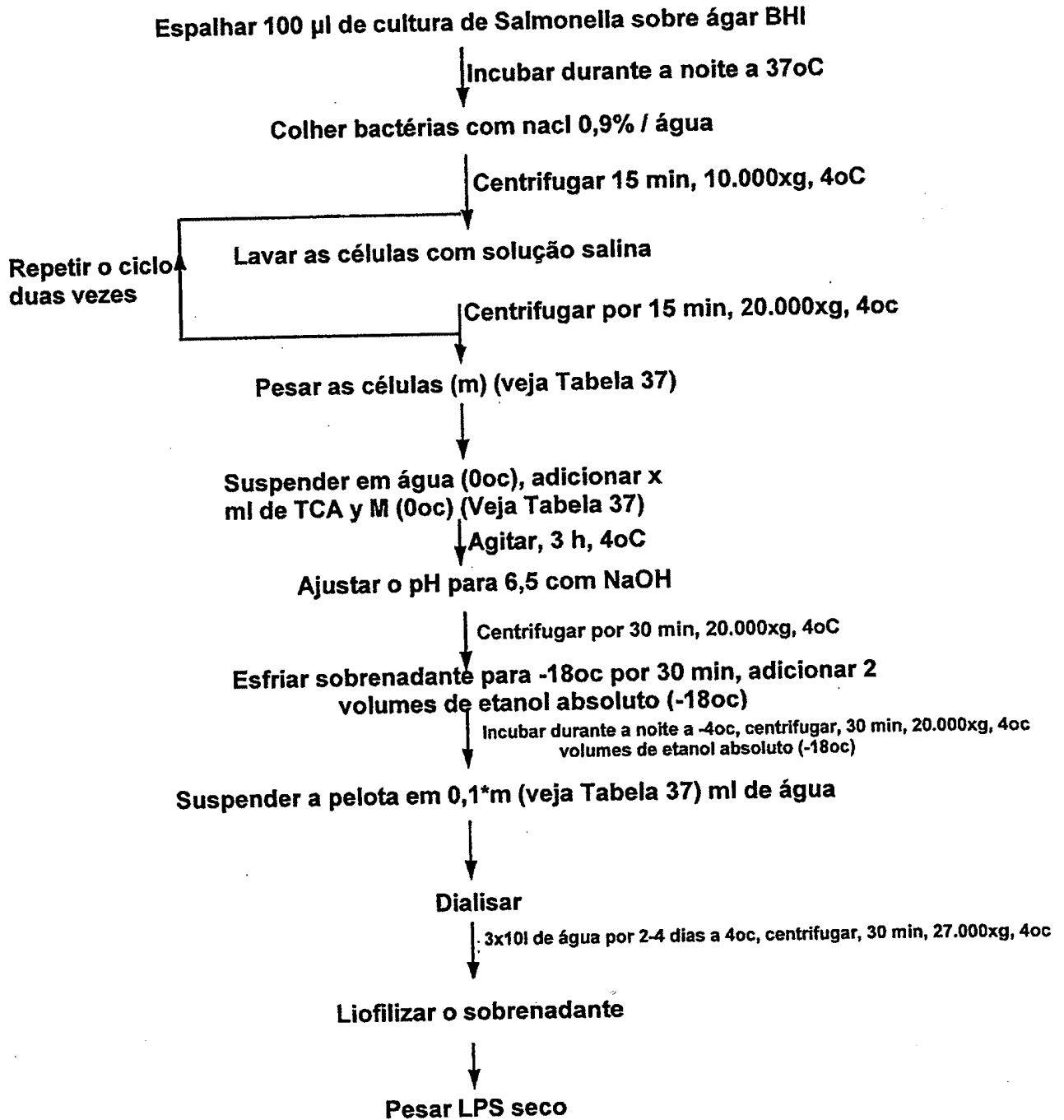


Fig. 33

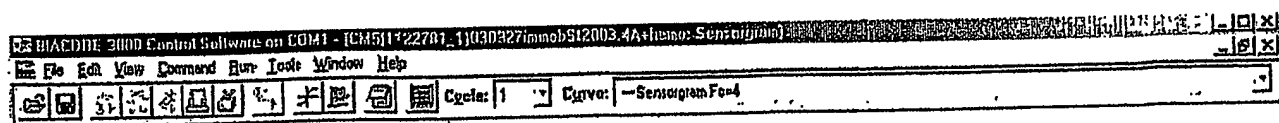


Fig. 35

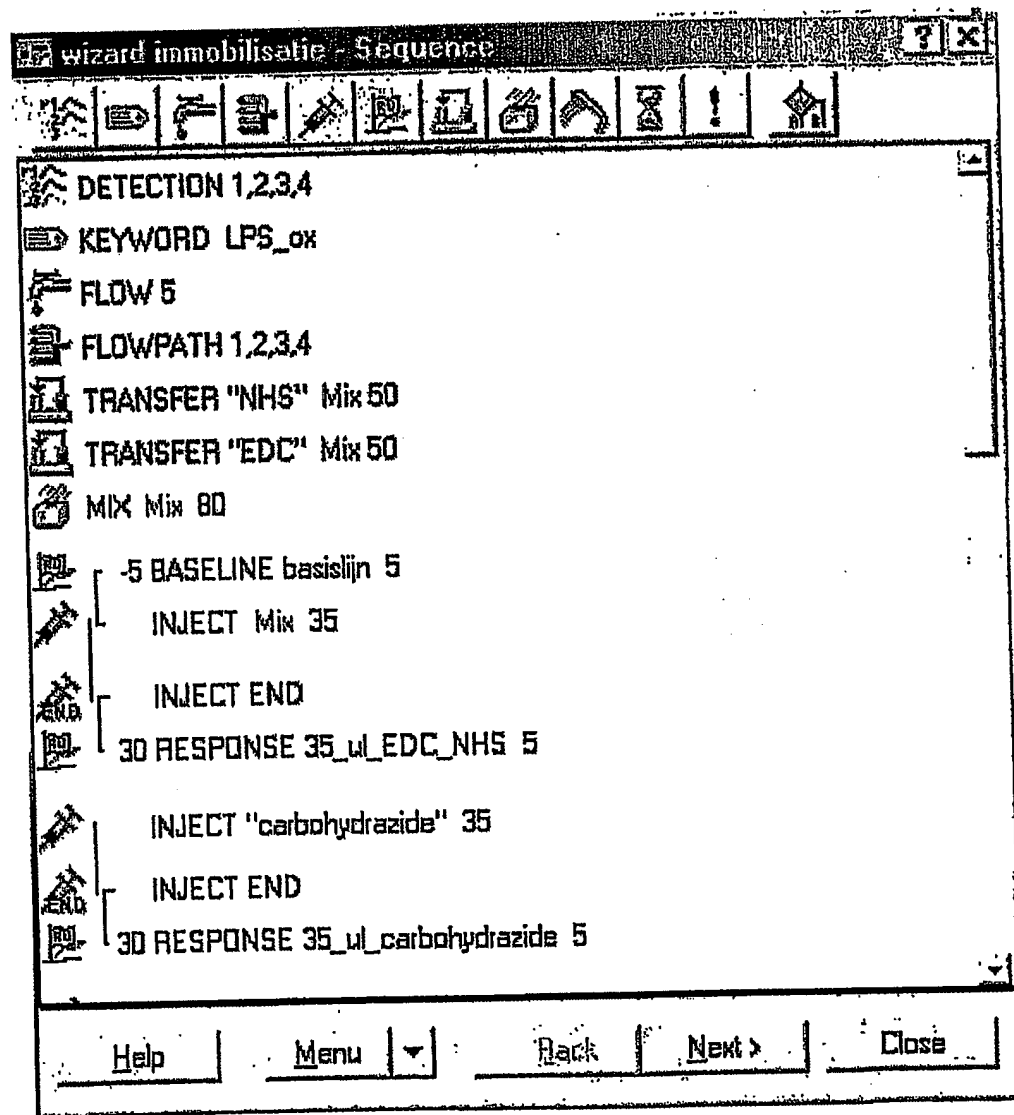


Fig. 36

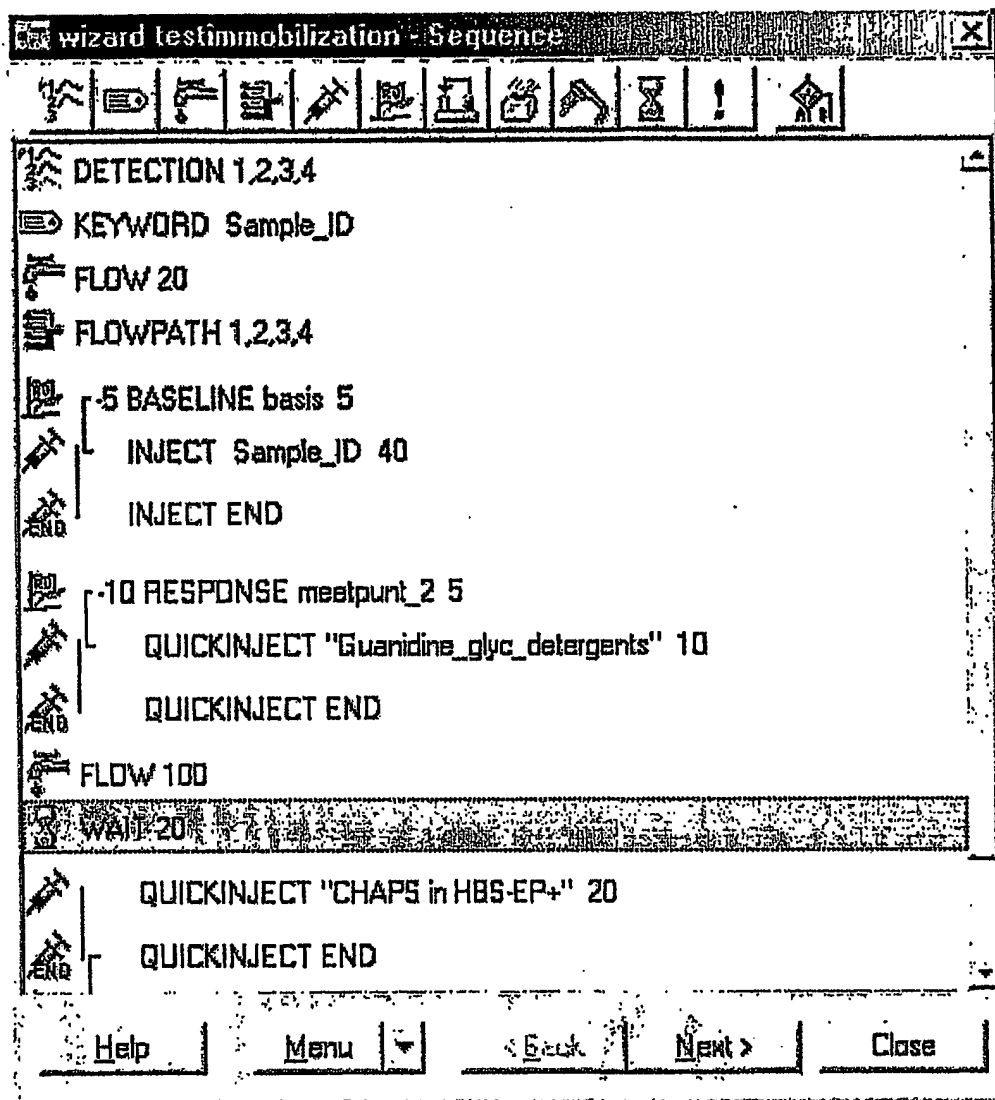


Fig. 37

Tampão de corrida: lote HBS-EP
 Chip: lote CM5
 Data de imobilização
 Reagentes
 Lote de EDC, data de reconstituição
 Lote de NHS, data de reconstituição
 Lote de etanol-amina
 Data de preparação de solução de carbohidrazida
 Data de preparação de solução de etanol-amina

LPS

Concentração mg/ml

Diluição antes da imobilização

Imobilização em

Fc1

Data de oxidação, nível de imobilização RU

Fc2

Data de oxidação, nível de imobilização RU

Fc3

Data de oxidação, nível de imobilização RU

Fc4

Data de oxidação, nível de imobilização RU

Lavagem

3 x 5 µl de solução de guanidina (Erro! Fonte de referência não encontrada)
 e 3 x 5 µl de CHAP5 (Erro! Fonte de referência não encontrada).

Amostra diluída com:

HBS-EP + nacl 0,85 M + CM-dextrano 1,0% + Tween 80 0,05%

Fluxo de 20 µl/min

Volume de injeção 40ml

Anti-soros somáticos 'O' de Salmonella

Anti-soro	diluído	lote	verd.
O4	1:20		20+380
O5	1:200		2+400
O6,7	1:20		20+380
O8	1:20		20+380
O9	1:20		20+380
O10	1:20		20+380
O12	1:20		20+380
O19	1:20		20+380
O poly E	1:20		20+380
O poly A-S	1:20		20+380
Anti grB de salmão	1:100		4+395
Anti grC de salmão	1:100		4+395
Anti grD de salmão	1:100		4+395
Anti grE de salmão	1:100		4+395
Soros de galinha	1:50 ou 1:200		
SPF-CH	1:50		6+295
EIA-ST	1:50		6+295
EIA-SE	1:200		1.5+300
SPA-PG	1:200		1.5+300
CH-SI	1:200		1.5+300

* 10 µl de solução de guanidina ((Erro! Fonte de referência não encontrada) e

Fluxo de 100 µl/min

Fig. 38

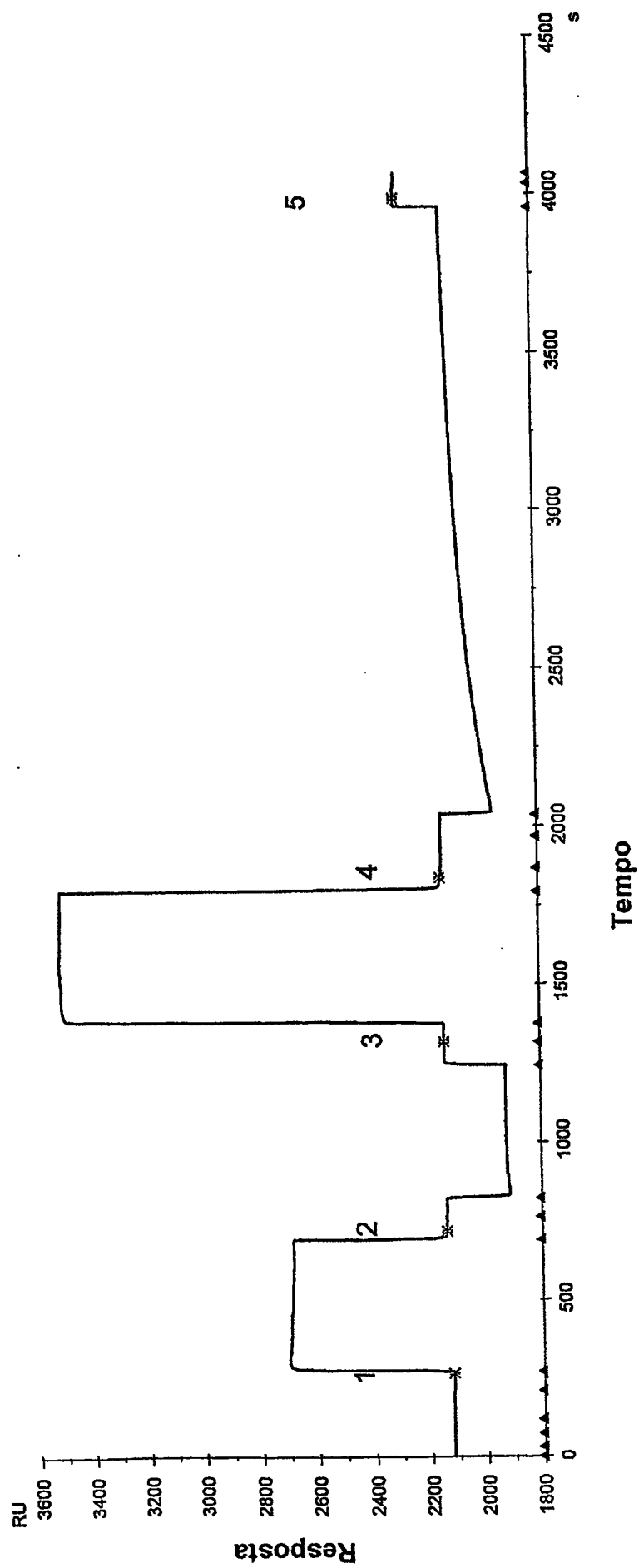


Fig. 39

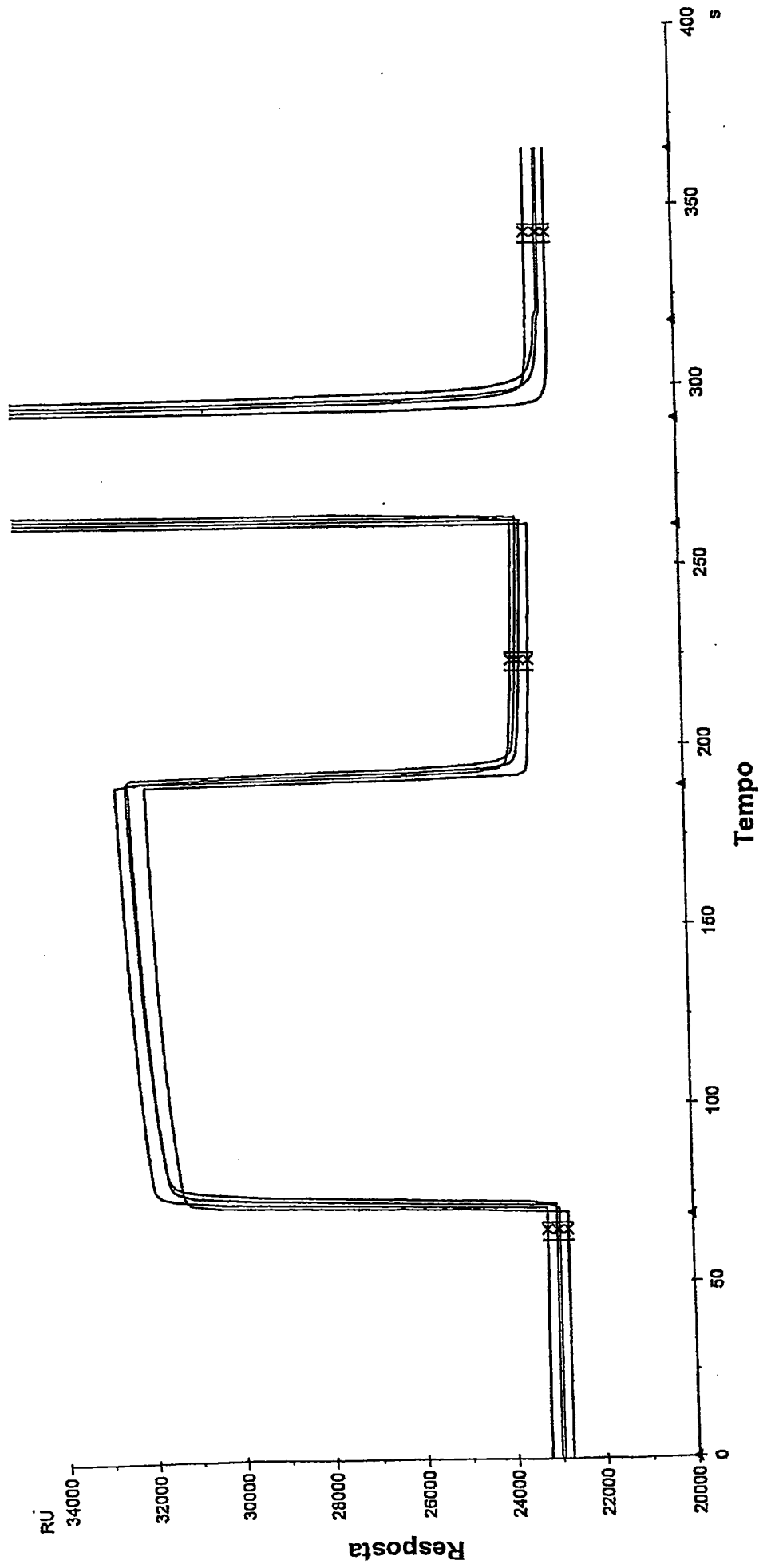


Fig. 40

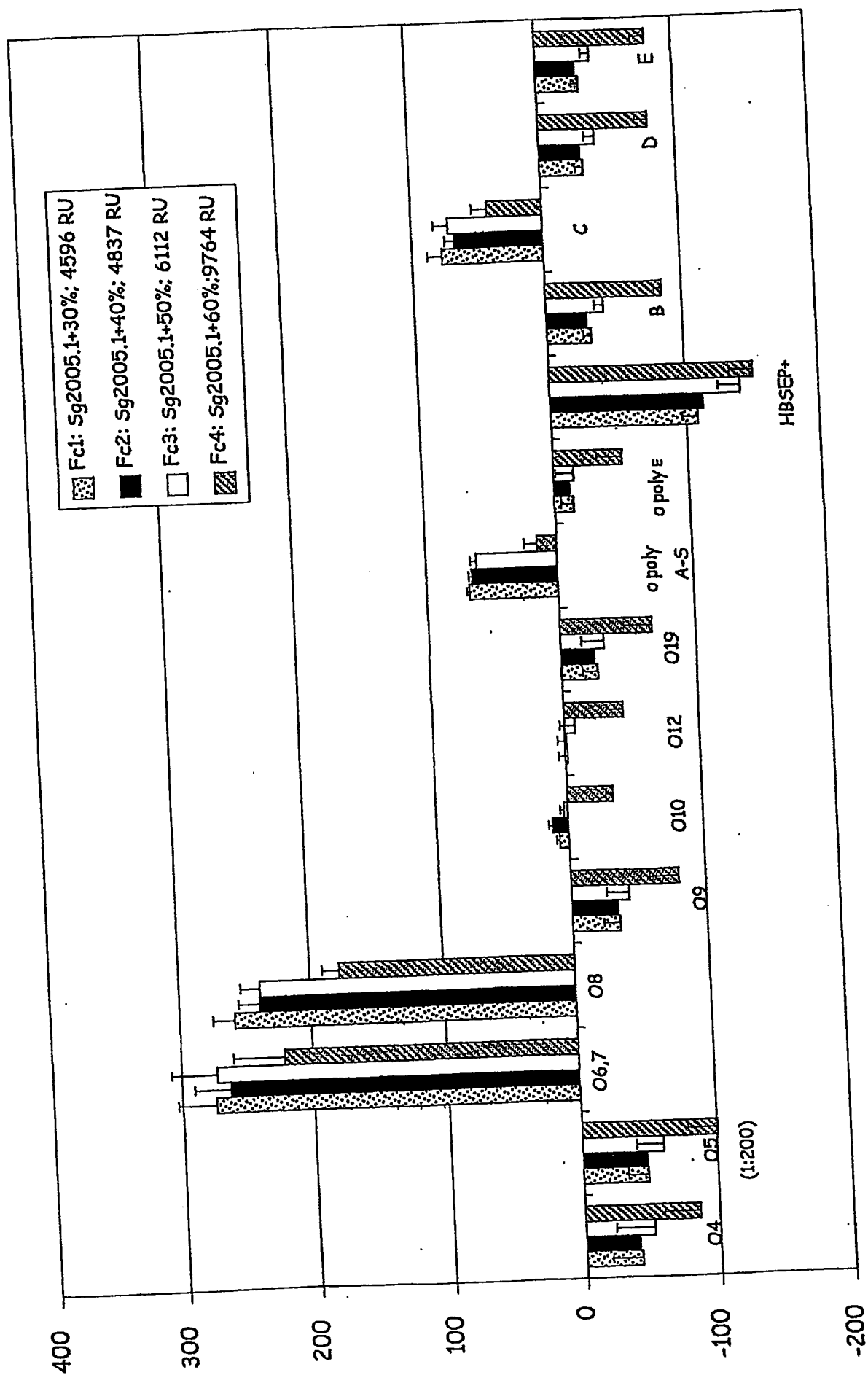


Fig. 41

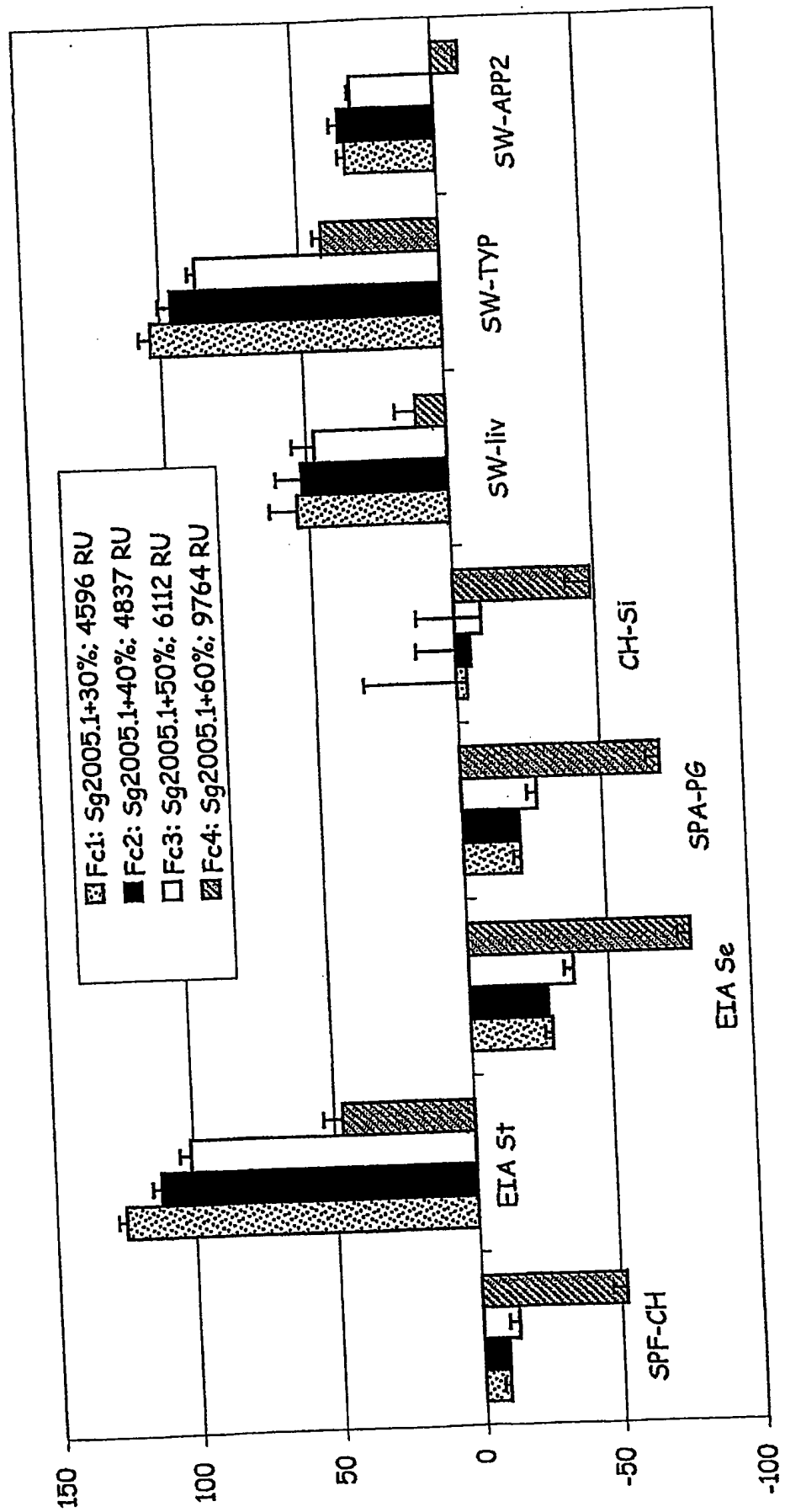


Fig. 42

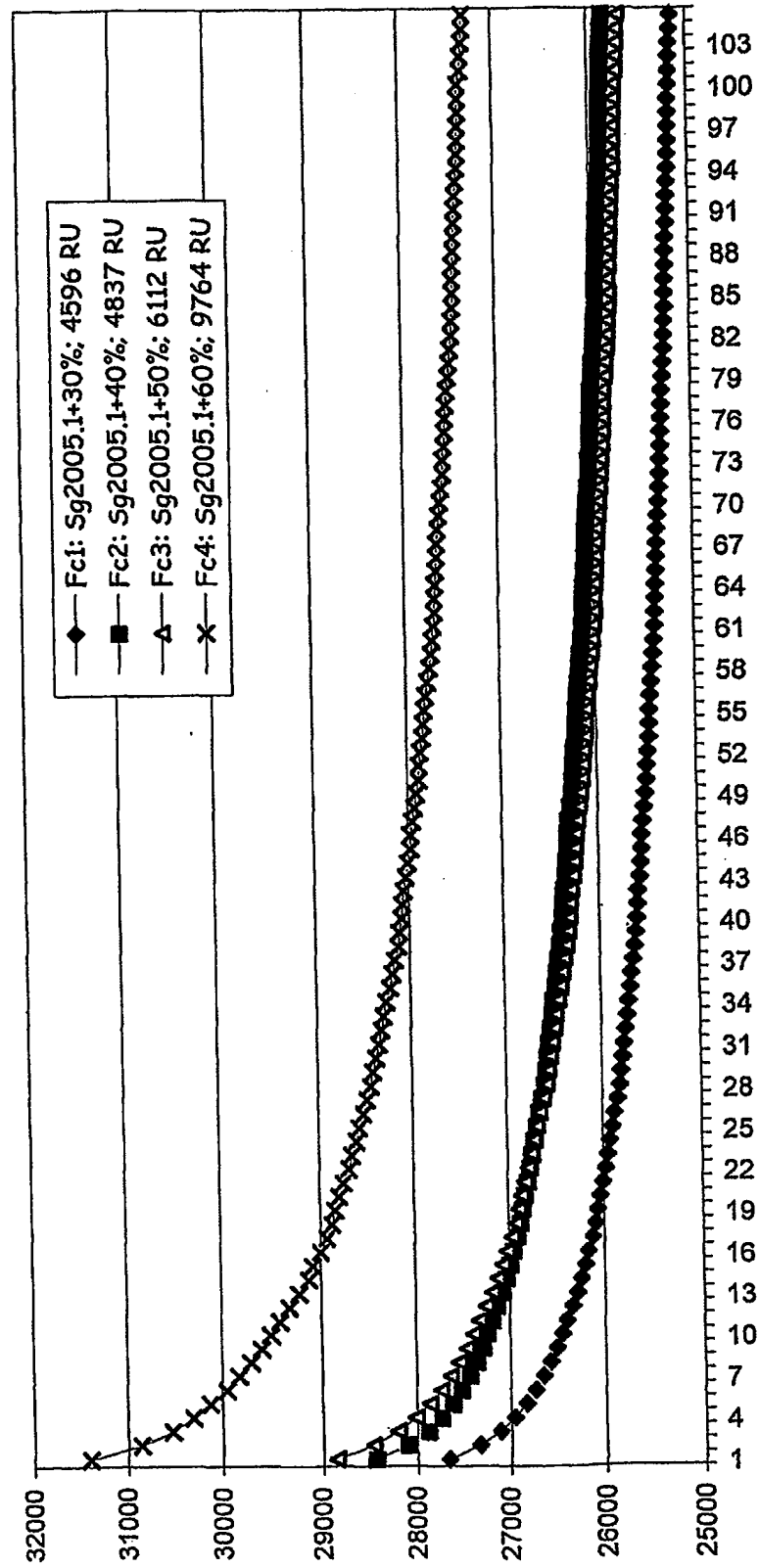


Fig. 43

RESUMO

“MÉTODOS PARA IMOBILIZAR UM POLISSACARÍDEO SOBRE UM CARREADOR, PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE UM ANTICORPO DIRECIONADO PARA UM ANTÍGENO DE UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA EM UMA AMOSTRA, E PARA DETERMINAR A PRESENÇA DE UMA BACTÉRIA GRAM-NEGATIVA EM UMA AMOSTRA, CARREADOR, COLEÇÃO DE MICROESFERAS OU DE GLÓBULOS, BIOSSENSOR, E, SISTEMA DE DETECÇÃO POR RESSONÂNCIA DE PLASMON DE SUPERFÍCIE”

10 A invenção refere-se ao campo da química e da diagnose, mais em particular à diagnose de infecções correntes e/ou passadas e/ou assintomáticas ou de uma história de exposição a uma bactéria gram-negativa (tal como uma Enterobacteriaceae ou uma Legionella). Ainda mais particularmente, a invenção refere-se à seleção de animais ou de produtos animais para a presença de microorganismos indesejados / não desejados. A invenção adicionalmente refere-se a um método para selecionar amostras para a presença de anticorpos direcionados contra microorganismos indesejados / não desejados e preferivelmente um tal método é realizado com o auxílio de um biossensor. A invenção também se refere a um método para imobilizar polissacarídeos em superfícies sólidas. A invenção adicionalmente proporciona superfícies sólidas com polissacarídeos imobilizados bem como aplicações de tais superfícies.

15

20