

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

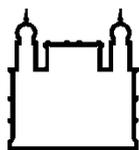
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

**DESENVOLVIMENTO DE KIT DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA
DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À METICILINA EM CEPAS DE
ESTAFILOCOCOS**

MARNE COIMBRA BATALHA CHAGAS

Rio de Janeiro

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

MARNE COIMBRA BATALHA CHAGAS

DESENVOLVIMENTO DE KIT DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À METICILINA EM CEPAS DE ESTAFILOCOCOS

Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de
Imunobiológicos

Rio de Janeiro

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C433

Chagas, Marne Coimbra Batalha.

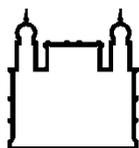
Desenvolvimento de kit diagnóstico rápido para detecção de resistência à meticilina em cepas de estafilococos / Marne Coimbra Batalha Chagas. – Rio de Janeiro, 2011.
xvi, 66f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2011.
Bibliografia: f. 61-66

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Proteína PBP2a . 3. Anticorpo monoclonal. 4. Diagnóstico. 5. *Lateral Flow*. I. Título.

CDD 579.353

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) e no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), sob orientação do Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

MARNE COIMBRA BATALHA CHAGAS

**DESENVOLVIMENTO DE KIT DIAGNÓSTICO RÁPIDO PARA
DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA À METICILINA EM CEPAS DE
ESTAFILOCOCOS**

Orientador: Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna

Dissertação aprovada em 14 de junho de 2011.

Examinadores:

Prof^ª. Dr^ª. Dália dos Prazeres Rodrigues
IOC / FIOCRUZ / Presidente

Prof^ª. Dr^ª. Kátia Regina Netto dos Santos
UFRJ

Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2011

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Gilson e Arli pelo constante apoio, carinho, cuidado e amor, e ao meu namorado Ricardo Stutz que sempre me incentivou nos momentos difíceis e compartilhou os momentos felizes.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente em minha vida, ajudando-me a vencer cada obstáculo.

À Bio-Manguinhos, ao diretor Artur Roberto Couto, pela oportunidade concedida e apoio financeiro.

Ao meu orientador Dr. José Procópio Moreno Senna, pelo constante apoio nos experimentos e orientação neste trabalho.

Ao mestre Edimilson Domingos da Silva pelo incansável apoio nos experimentos e por conceder o espaço do LATED para desenvolvimento neste trabalho.

Aos companheiros e amigos do LATED que me acolheram e incentivaram durante todo o trabalho experimental.

Ao Dr. Marco Alberto Medeiros e colegas do LATER, por conceder o espaço do laboratório para realização de parte deste trabalho.

À Claudia Molinaro e funcionários do SEICA que me ajudaram na realização de parte dos processos de conjugação.

Aos amigos do MPTI pelos momentos descontraídos e pela ajuda durante as disciplinas cursadas.

Aos professores, coordenadora e secretária do MPTI, pelo suporte dado ao desenvolvimento desta dissertação.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Infecções relacionadas à Assistência à Saúde	1
1.1.1. Infecções relacionadas à Assistência à Saúde e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	2
1.2. Patógeno: <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.2.1. Infecções por <i>Staphylococcus aureus</i>	5
1.2.2. Mecanismo de resistência à penicilina	6
1.2.3. Mecanismo de resistência à meticilina/oxacilina	8
1.3. Métodos laboratoriais de identificação bacteriana e resistência à meticilina/oxacilina em estafilococos.....	10
1.3.1. Métodos convencionais.....	10
1.3.2. Métodos moleculares	13
1.4. Anticorpo monoclonal em imunodiagnóstico	13
1.4.1. Imunocromatografia de fluxo lateral (<i>Lateral Flow</i>)	14
1.5. Processos de conjugação.....	16
1.6. Importância do diagnóstico clínico.....	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Obtenção do anticorpo monoclonal anti-PBP2a.....	21
3.1.1. Purificação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a.....	22
3.1.2. Análise do sobrenadante de cultura de células e das frações purificadas	22
3.1.3. Diálise das frações purificadas.....	23
3.1.4. Concentração das amostras.....	23

3.1.5. Caracterização físico-química do anticorpo monoclonal anti-PBP2a	23
3.1.6. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a por imunoenensaio enzimático (ELISA).....	24
3.2. Processos de conjugação: microesferas coloridas x Mab anti-PBP2a	25
3.2.1. Quantificação das microesferas	25
3.2.2. Acoplamento covalente	25
3.2.3. Adsorção passiva	26
3.2.4. Caracterização do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a	26
3.2.5. Avaliação do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a por <i>Lateral Flow</i>	27
3.3. Avaliação imunológica de células MRSA, MSSA e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativo (SCN)	28
3.3.1. Cultivo de células MRSA, MSSA e SCN	28
3.3.2. Amostras de células MRSA, MSSA e <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase-negativo (SCN)	29
3.3.3. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a contra células íntegras MRSA e SCN por ELISA	29
3.3.4. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a contra células íntegras MRSA e MSSA por microscopia.....	30
3.4. Ensaio com células MRSA e MSSA por <i>Lateral Flow</i> utilizando o conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a.....	30
3.4.1. Impregnação das membranas com o anticorpo monoclonal anti-PBP2a	30
3.4.2. Soluções tampão testadas na plataforma imunocromatográfica de <i>Lateral Flow</i>	31
4. RESULTADOS.....	32
4.1. Anticorpo monoclonal anti-PBP2a	32
4.1.1. Purificação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a e análise das frações purificadas	32
4.1.2. Caracterização físico-química do anticorpo monoclonal anti-PBP2a	35
4.1.3. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a.....	38
4.2. Processos de conjugação.....	39
4.2.1. Quantificação das microesferas	39
4.2.2. Acoplamento covalente	40
4.2.3. Adsorção passiva	40
4.2.4. Caracterização do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a	40
4.2.5. Avaliação do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a por <i>Lateral Flow</i>	43

4.3. Avaliação imunológica de células MRSA, MSSA e SCN	44
4.3.1. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a contra células íntegras MRSA e SCN por ELISA	44
4.3.2. Avaliação da atividade <i>in vitro</i> do anticorpo monoclonal anti-PBP2a contra células íntegras MRSA e MSSA por microscopia ótica	45
4.4. Avaliação do ensaio de <i>Lateral Flow</i> com células íntegras e lisadas MRSA, MSSA e SCN.....	46
5. DISCUSSÃO	50
5.1. Caracterização do anticorpo monoclonal anti-PBP2a.....	51
5.2. Processos de conjugação.....	51
5.3. Amostras empregadas na plataforma imunocromatográfica de <i>Lateral Flow</i>	54
5.4. Padronização da plataforma imunocromatográfica de <i>Lateral Flow</i> utilizando amostras MRSA e MSSA - Prova de princípio	56
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϵ – Coeficiente de extinção

μg – Micrograma

μL - Microlitro

μm – Micrômetro

ABS – Absorvância

AP – *Alkaline phosphatase* (Fosfatase alcalina)

ATCC – *American Type Culture Collection*

BSA – *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)

C – Concentração

CA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido na comunidade

CECAL – Centro de Criação de Animais de Laboratório

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

cm – Centímetro

CMI – Concentração mínima inibitória

CO_2 – Gás carbônico

COOH – Grupamento carboxílico

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade ótica

DPP – *Dual Path Plataform*

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

F_{dil} – Fator de diluição

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g/L – Grama/litro

GlcNAc – β -1-4-N-acetilglicosamina

HA-MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina adquirido no hospital

HIV – *Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

HPLC – *High-performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

HRP – *Horseradish peroxidase* (Peroxidase de raiz forte)

H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico

IEF – *Isoelectric focusing* (Focalização isoelétrica)

IgG – Imunoglobulina G

IrAS – Infecções relacionadas à Assistência à Saúde

LAEAN – Laboratório de Experimentação Animal

LATAM – Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais

LATED – Laboratório de Tecnologia Diagnóstica

LATER – Laboratório de Tecnologia Recombinante

LB – Luria-Bertani (meio de cultura)

MA – Membrana absorvente

Mab – *Monoclonal antibody binding* (Anticorpo monoclonal ligado)

MC – Membrana do conjugado

mg - Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MN – Membrana de nitrocelulose

mol/L – Molaridade/litro

MRSA – *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina)

MSSA – *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* sensível à metilina)

MurNAc – *N-acetylmuramic acid* (Ácido N-acetilmurâmico)

NaCl – Cloreto de sódio

NH₂ – Grupamento amina

NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico

NATIVE-PAGE – *Native polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese nativa em gel de poliacrilamida)

NK – *Natural killer*

ng – Nanograma

nL – Nanolitro

nm – Nanômetro

PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

- PBP – *Penicillin-binding proteins* (Proteínas de ligação à penicilina)
- PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato de sódio)
- PBS-T – *Phosphate buffered saline-Tween 20* (Tampão fosfato de sódio com Tween 20)
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- pg - Picograma
- pH – Potencial hidrogeniônico
- pI – Ponto isoelétrico
- PM – Peso molecular
- p/v – Peso/volume
- Rede RM – Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana
- SBN – Sobrenadante
- SCN – *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo
- SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)
- SCC*mec* – *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*
- SP – *Sample pad* (Membrana da amostra)
- Sulfo-NHS – N-Hydroxysuccinimide
- TA – Temperatura ambiente
- TMB – Tetrametilbenzidina
- U – Unidade
- UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
- UTI – Unidade de terapia intensiva
- VDTEC – Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico
- VISA – *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina)
- VRE – *Vancomycin-resistant Enterococcus faecalis* (*Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina)
- VRSA – *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Prevalência mundial de MRSA.....	3
Figura 1.2: Micrografia eletrônica da bactéria Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Figura 1.3: Representação esquemática da ligação cruzada estabelecida entre duas cadeias glicano no peptidoglicano de <i>Staphylococcus aureus</i>	6
Figura 1.4: Estrutura química do antibiótico β -lactâmico penicilina G.	7
Figura 1.5: Estrutura terciária da PBP2a de <i>S. aureus</i>	9
Figura 1.6: Fluxograma geral de identificação bacteriana utilizando métodos de análise convencionais.	11
Figura 1.7: Estrutura da plataforma imunocromatográfica de <i>Lateral Flow</i>	16
Figura 1.8: Ilustração das possíveis orientações de ligação entre IgG's e microesferas.....	18
Figura 3.1: Componentes da plataforma imunocromatográfica de <i>Lateral Flow</i>	27
Figura 4.1: Perfil cromatográfico do sobrenadante de cultura de células clone 38, hibridoma 77, lote 04/2009.	33
Figura 4.2: Análise do sobrenadante de cultura de células e das frações purificadas no programa <i>Image Master</i>	34
Figura 4.3: Curva padrão de BSA adicionado nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	35
Figura 4.4: Focalização isoeétrica do Mab anti-PBP2a em gel de poliacrilamida IEF-PAGE gradiente de pH 3-9 analisada no programa <i>Image Master</i>	36
Figura 4.5: Análise do anticorpo monoclonal anti-PBP2a no programa <i>Image Master</i>	37
Figura 4.6: Análise da homogeneidade do Mab anti-PBP2a em gel de poliacrilamida NATIVE-PAGE gradiente de concentração 8-25% utilizando o programa <i>Image Master</i>	38
Figura 4.7: Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a por ELISA	39
Figura 4.8: Padrão de bandas estabelecido para o conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a 0,5 mg/mL.	41
Figura 4.9: Espectro de varredura da IgG pura diluída 1:4 cuja faixa de leitura variou entre 200 a 400 nm.	42

Figura 4.10: Espectro de varredura do sobrenadante de microesfera conjugada ao Mab anti-PBP2a 0,25 mg/mL diluído 1:2, cuja faixa de leitura variou entre 200 a 600 nm.	42
Figura 4.11: Avaliação do reconhecimento da proteína PBP2a em amostras íntegras MRSA COL (<i>mecA</i> +), MRSA COL (<i>mecA</i> -) e SCN (<i>mecA</i> -) pelo anticorpo monoclonal anti-PBP2a por ELISA.....	45
Figura 4.12: Amostras de colônias íntegras MRSA e MSSA coradas pelo método de Gram e analisadas por microscopia ótica.	46
Figura 4.13: Ensaio de <i>Lateral Flow</i> com amostras lisadas MRSA e SCN.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Reativos utilizados no processo de conjugação pelo método do acoplamento covalente.	26
Tabela 3.2: Reativos utilizados no processo de conjugação pelo método de adsorção passiva.	26
Tabela 3.3: Amostras de células MRSA, MSSA e SCN empregadas nos ensaios imunológicos.	29
Tabela 4.1: Determinação da concentração média (%) das microesferas utilizadas no processo de conjugação.	40
Tabela 4.2: Avaliação do conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a por <i>Lateral Flow</i> (ensaio direto).	43
Tabela 4.3: Avaliação do conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a por <i>Lateral Flow</i> (ensaio indireto).	44
Tabela 4.4: Avaliação das amostras bacterianas íntegras MRSA e MSSA na plataforma imunocromatográfica de <i>Lateral Flow</i> utilizando o conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a.	47
Tabela 4.5: Avaliação das amostras bacterianas lisadas MRSA e MSSA na plataforma imunocromatográfica de <i>Lateral Flow</i> utilizando o conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a.	48
Tabela 4.6: Avaliação das amostras bacterianas lisadas MRSA e SCN na plataforma imunocromatográfica de <i>Lateral Flow</i> utilizando o conjugado microesferas coradas x IgG cão.	49

RESUMO

O surgimento de resistência a antimicrobianos em bactérias está se agravando ano após ano, constituindo-se um problema de saúde pública em hospitais e centros de tratamento ao redor do mundo. No Brasil, a resistência a meticilina em *Staphylococcus aureus* (MRSA) chega a 29 % dos casos detectados anualmente. Atualmente, a metodologia convencional para a identificação de MRSA pode levar 48 horas, portanto, este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um teste para diagnóstico rápido baseado na tecnologia de imunocromatografia de fluxo lateral usando um anticorpo específico contra a proteína PBP2a, a qual confere resistência ao *Staphylococcus aureus*, permitindo a identificação em minutos, a partir de colônias isoladas. O anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi purificado e empregado em um processo de conjugação a microesferas de látex coloridas para a implementação do teste rápido. Os resultados iniciais demonstraram a capacidade do anticorpo de reconhecer a PBP2a em amostras de MRSA, porém foram observados problemas de inespecificidade que deverão ser solucionados para dar confiabilidade ao teste proposto.

ABSTRACT

The emergence of antibiotic resistance in bacteria is getting worse year after year, becoming a public health problem in hospitals and treatment centers around the world. In Brazil, methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) reaches 29% of cases detected annually. Currently, the conventional methodology for identification of MRSA may take 48 hours of lengthy phenotypical tests, so this work aims at developing a rapid diagnostic test based on the lateral flow immunochromatography protocol using a specific antibody against the protein PBP2a, which confers the methicillin-resistance phenotype to *Staphylococcus aureus*, allowing a prompt identification from isolated colonies. The monoclonal antibody anti-PBP2a was purified and used in a process of conjugation to colored latex microspheres for the implementation of the rapid test. Initial results demonstrated the ability of the antibody to recognize the PBP2a in samples of MRSA, but inespecificity issues will have to be solved to improve reliability of the test proposed.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecções relacionadas à Assistência à Saúde

As Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IrAS) são todas as infecções adquiridas no ambiente hospitalar. A origem pode ser endógena quando causada por microrganismos do próprio paciente devido ao desequilíbrio entre sua microbiota e os mecanismos de defesa, ou exógena, transmitida por indivíduos colonizados como, por exemplo, os profissionais de saúde (Cavalcante 2000).

As infecções hospitalares constituem um importante problema de saúde pública em todo o mundo sendo responsáveis, nos Estados Unidos, por aproximadamente 99.000 óbitos/ano, atingindo gastos que podem chegar a U\$ 11 bilhões/ano (Schwegman 2009). No Brasil, o número de internações em unidades de saúde pode chegar a 15 milhões/ano. A taxa de pacientes que adquirem infecções hospitalares é de 16%, das quais aproximadamente 47% são causadas por *Staphylococcus* sp. (Fernandes 2000, Brasil 2004, ANVISA 2009a).

Atualmente, cepas *Staphylococcus* coagulase-negativo são responsáveis por 29% das infecções hospitalares emergentes no Brasil seguidas dos microrganismos: *Klebsiella pneumoniae* (13%), *Pseudomonas aeruginosa* (12%), *Acinetobacter* sp. (11%), *Enterobacter* sp. (6%), *Enterococcus* sp. (5%) e *Escherichia coli* (3%) segundo dados recolhidos pela Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) (ANVISA 2009a).

Portanto, o desafio imposto aos hospitais é o aumento no combate a patógenos resistentes à terapia antimicrobiana. De acordo com a Rede de Segurança Nacional em Saúde dos Estados Unidos, aproximadamente 60% dos *Staphylococcus aureus* são resistentes à meticilina (MRSA) (Leanne *et al.* 2009). No Brasil, de acordo com a Rede RM (ANVISA 2009b), o percentual de resistência é observado em 61% dos *Staphylococcus aureus*, evidenciando este patógeno como o principal responsável pelas infecções hospitalares no Brasil.

1.1.1. Infecções relacionadas à Assistência à Saúde e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

O *Staphylococcus aureus* é atualmente o maior responsável pelas infecções hospitalares em todo o mundo, atingindo cada vez mais a comunidade onde provoca crescente preocupação. Tal fato se deve à capacidade do patógeno em causar uma diversidade de infecções que apresentam risco de morte, à facilidade de adaptação a diferentes condições ambientais e à sua virulência intrínseca (Lowy 2003).

A maioria das infecções causadas por cepas MRSA tinha origem em unidades de saúde, entretanto, estudos mostraram tais cepas isoladas em indivíduos que não tiveram contato com o sistema de saúde, comprovando a evolução de cepas MRSA, diferindo das cepas nosocomiais, as quais foram transmitidas à comunidade (Grundmann *et al.* 2006).

As infecções causadas por cepas MRSA adquiridas na comunidade (CA-MRSA) diferem em suas características epidemiológicas, clínicas e microbiológicas daquelas causadas por cepas adquiridas no ambiente hospitalar (HA-MRSA), uma vez que colonizam indivíduos jovens e freqüentemente estão associadas a infecções de pele, enquanto HA-MRSA está associada a infecções no trato urinário, respiratório e pele. Outro aspecto diferencial é de que CA-MRSA é mais suscetível aos agentes antimicrobianos se comparado a HA-MRSA (Del Giudice *et al.* 2006, David *et al.* 2011).

Neste contexto, é importante ressaltar a relevância clínica da colonização assintomática desenvolvida pelo *S. aureus*, dado que um indivíduo pode ser veículo de contaminação, transmitindo a outros o patógeno que muitas vezes é causador de um processo infeccioso e, num paciente hospitalizado com o organismo debilitado, pode ser crucial em seu processo de recuperação, aumentando o tempo de internação e os custos hospitalares. No ambiente hospitalar, o indivíduo colonizado pode ser um paciente, um visitante ou o próprio profissional de saúde (Góngora-Rubio *et al.* 1997, Santos *et al.* 2007).

A alta prevalência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em hospitais tem sido associada com o aumento da mortalidade de pacientes e elevação dos custos em saúde, com distribuição em países da Europa, Américas, África do Norte, Oriente Médio e Ásia Oriental conforme mostrado na figura 1.1 (Grundmann *et al.* 2006, Deurenberg *et al.* 2007). Os custos incluem maior período de internação, antibioticoterapia prolongada, diagnósticos complementares,

procedimentos terapêuticos e, indiretamente, diminuição da produtividade. Há também os gastos envolvidos em casos de contenção de surtos e mudança na prescrição de antibióticos utilizados rotineiramente na prática clínica (Grundmann *et al.* 2006).

Na tentativa de controlar a disseminação do patógeno no ambiente hospitalar, muitos pacientes colonizados acabam sendo isolados para evitar danos e/ou riscos a outros pacientes como, por exemplo, queimados, HIV - positivos ou que fazem diálise (Santos *et al.* 2007). Entretanto, a conduta de isolamento apenas minimiza a disseminação, apresentando-se insuficiente para determinar o controle. Logo, faz-se necessário o rápido e correto diagnóstico, a ser adotado pelos hospitais como medida de prevenção e controle destes microrganismos. O diagnóstico para identificação de microrganismos resistentes representa importante medida, possibilitando o tratamento adequado do paciente, garantindo menor contaminação e transmissão de cepas patogênicas dentro das unidades de saúde e diminuição nos custos em caso de uma infecção por MRSA (Cavalcanti *et al.* 2005, Leanne *et al.* 2009, Matos *et al.* 2010).

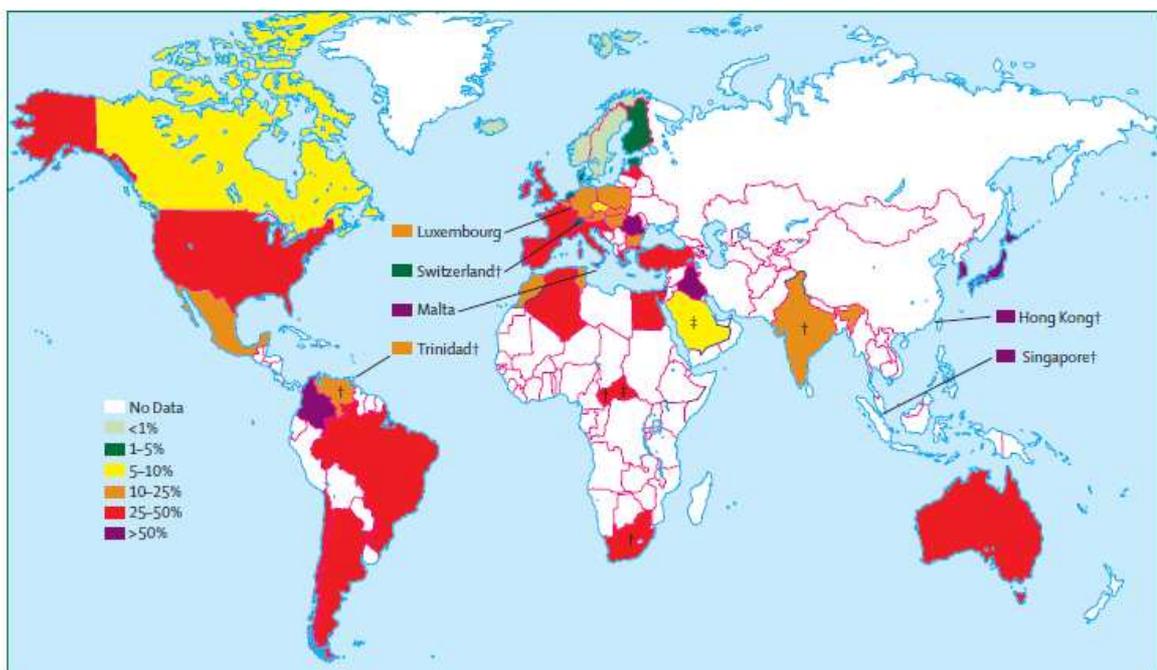


Figura 1.1: Prevalência mundial de MRSA (Grundmann *et al.* 2006).

1.2. Patógeno: *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um coco Gram-positivo membro da família *Staphylococcaceae*, importante causador de infecções nos ambientes comunitário e hospitalar. O patógeno pode ser encontrado na forma isolada ou formando estrutura em cachos, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5 μm (Figura 1.2, Stapleton & Taylor 2002). A colonização ocorre comumente nos seres humanos e geralmente em superfícies externas da pele, como as regiões umbilical, axilar, interdigital e perineal, e do trato respiratório superior (vias nasais), podendo ocorrer transmissão e disseminação para outros indivíduos (Berger-Bächli & Rohrer 2002, Calvalcanti *et al.* 2005).



Figura 1.2: Micrografia eletrônica da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (Science Photo Library 2011).

O genoma dos *Staphylococcus* consiste de um cromossomo circular, plasmídeos e transposons. Os genes são responsáveis pela virulência e resistência aos antibióticos e são transferidos entre cepas, espécies ou outras bactérias gram-positivas, através dos elementos extra-cromossomiais (Lowy 1998).

O *S. aureus* é diferenciado das demais espécies estafilocócicas principalmente devido à pigmentação das colônias e resultados positivos dos testes de coagulase e fermentação do manitol (provas enzimáticas e bioquímicas) (Lowy 1998).

1.2.1. Infecções por *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* pode provocar manifestações clínicas ou apenas colonizar sem ocasionar lesões aparentes, caracterizando um portador assintomático. No entanto, é um patógeno oportunista e de acordo com as circunstâncias do ambiente ou mesmo do hospedeiro pode levar a infecções (Stapleton & Taylor 2002, Calvalcanti *et al.* 2005).

As infecções causadas incluem pneumonia (infecção dos pulmões), mastite (infecção das glândulas mamárias), infecções de pele (impetigo e celulite), osteomielite (infecção óssea), endocardite (infecção do revestimento endotelial do coração e válvulas), abscessos cerebrais (infecção do sistema nervoso central) e bacteremia (bactérias presentes no sangue). Assim, os portadores de *S. aureus* desempenham um papel fundamental na epidemiologia e patogênese da infecção como potenciais fatores de risco, cuja transmissão é veiculada por contato interpessoal direto e uso de objetos contaminados (Vandenbergh & Verbrugh 1999, Humphreys *et al.* 2009).

Outros fatores de risco para colonização e/ou infecção incluem idade avançada, internação prévia, estadia hospitalar duradoura, terapia antibiótica longa, exposição ao paciente colonizado ou infectado, procedimentos invasivos e admissão em unidade para queimados ou de terapia intensiva (UTIs) (Korn *et al.* 2001).

Também é importante ressaltar que cepas de *Staphylococcus* possuem a capacidade de adaptar-se rapidamente à pressão por antibióticos, como o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, que além de resistência a praticamente todos os β -lactâmicos, apresentam uma tendência a acumular e desenvolver resistência a outros antibióticos, incluindo os glicopeptídeos, os quais têm sido utilizados como importante recurso contra MRSA multirresistente (Berger-Bächi & Rohrer 2002).

1.2.2. Mecanismo de resistência à penicilina

A parede celular do *S. aureus* apresenta uma estrutura típica encontrada em bactérias Gram-positivas, o peptidoglicano, polímero que consiste de cadeias glicano ligadas entre si através de peptídeos, formando uma estrutura forte e elástica que confere proteção mecânica ao microrganismo, auxiliando na manutenção do equilíbrio osmótico celular. A cadeia glicano é composta por resíduos alternados de β -1-4-N-acetilglicosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) com comprimento variando de 3 a 10 unidades de dissacarídeo e comprimento máximo entre 23-26 unidades (Giesbrecht *et al.*1998, Scheffers & Pinho 2005).

Cada resíduo de ácido N-acetilmurâmico possui uma cadeia constituída pelos aminoácidos L-alanina, D-glutamina, L-lisina e D-alanina denominada peptídeo-tronco (Figura 1.3). Uma pentaglicina conecta a L-lisina de um peptídeo-tronco à D-alanina de outro, formando as ligações cruzadas ou reações de transpeptidação na superfície externa da membrana plasmática, catalisada pelas proteínas de ligação à penicilina (*penicillin-binding proteins* - PBPs).

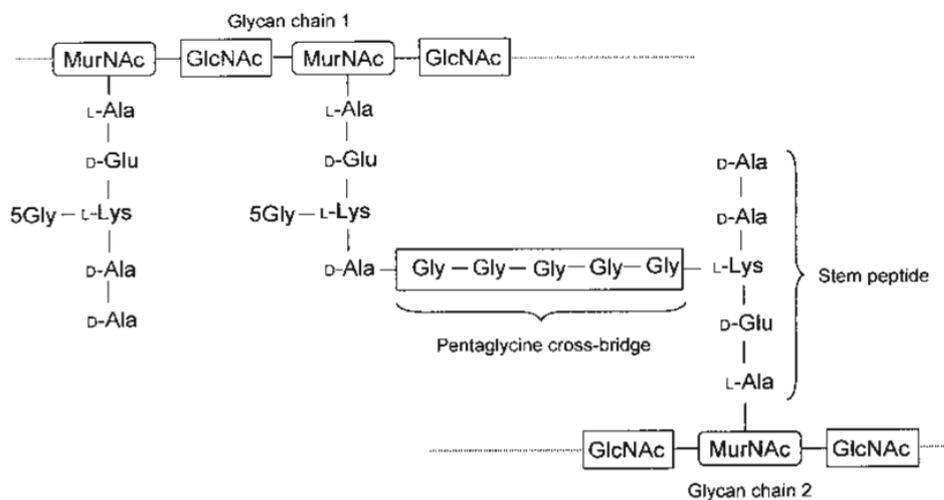


Figura 1.3: Representação esquemática da ligação cruzada estabelecida entre duas cadeias glicano no peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* (Stapleton & Taylor 2002).

A PBP possui um sítio responsável pela transpeptidação (ligação cruzada) e outro pela transglicosilação (extensão da cadeia glicana). O *Staphylococcus aureus* possui quatro PBPs caracterizadas como PBP1, PBP2, PBP3 e PBP4 (Stapleton & Taylor 2002).

Os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos inibem o crescimento das bactérias interferindo na síntese da parede celular. Os β -lactâmicos apresentam estrutura semelhante à D-alanina-D-alanina terminal do peptídeo-tronco e assim, ligam-se covalentemente ao sítio ativo da PBP, inibindo o domínio de transpeptidação e formação da ligação cruzada, bloqueando a síntese de peptidoglicano. Na ausência de ligação cruzada do peptidoglicano, a parede celular se torna fraca e tende a lise e morte celular (Stapleton & Taylor 2002, Chambers 2005). Como exemplo de antimicrobiano β -lactâmico podemos citar a penicilina (penicilina G), caracterizada pela presença de um anel lactâmico de quatro lados mostrado na figura 1.4 (Stapleton & Taylor 2002).

Com a introdução da penicilina no início de 1940, muitos pacientes que anteriormente estavam condenados à morte por infecções e bacteremias apresentaram melhoras no prognóstico (Lowy 2003). Entretanto, pouco tempo depois (1942) começaram a surgir cepas resistentes identificadas primeiramente nos hospitais e em seguida na comunidade que sintetizavam β -lactamase, uma enzima predominantemente extracelular responsável por hidrolisar o anel β -lactâmico presente na penicilina, tornando este antimicrobiano inativo (Rammelkamp & Maxon 1942). O mecanismo molecular de resistência à penicilina é mediado pelo gene *blaZ* que codifica a enzima β -lactamase e está sob o controle de dois genes reguladores adjacentes, o antirepressor *blaR1* e o repressor *blaI* (Lowy 2003).

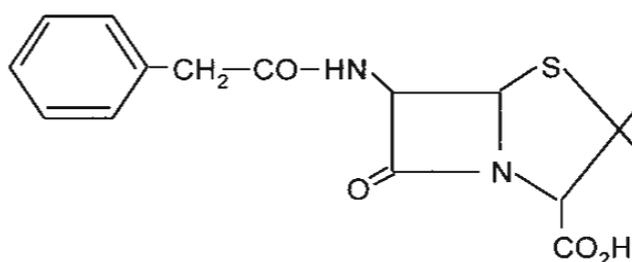


Figura 1.4: Estrutura química do antibiótico β -lactâmico penicilina G (Stapleton & Taylor 2002).

Desde então, começaram os esforços na síntese de novas moléculas resistentes à β -lactamase. Em 1961, introduziu-se a meticilina, um derivado da penicilina por substituição do grupamento fenol por um grupo metoxi, que devido ao impedimento estérico exercido em torno da ligação amida, mostrou resistência e reduzida afinidade por β -lactamases estafilocócicas. Entretanto, logo após sua

introdução observaram-se casos isolados de resistência (Stapleton & Taylor 2002, Lowy 2003).

1.2.3. Mecanismo de resistência à meticilina/oxacilina

O mecanismo molecular de resistência à meticilina consiste na aquisição de um elemento genético denominado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) pela cepa *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA). O determinante de resistência é o gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina adicional denominada PBP2a com reduzida afinidade pelos antimicrobianos β -lactâmicos (Figura 1.5). A PBP2a é uma transpeptidase que juntamente com o sítio transglicosilase da PBP2 nativa do *S. aureus* realiza a função de biossíntese da parede celular (Grundmann *et al.* 2006, Chambers & DeLeo 2009).

A PBP2a possui estrutura semelhante às demais PBPs, com síntese regulada pelas proteínas *MecI* e *MecR1* e pelo sistema *blaZ* que juntamente com mutações e fatores internos e externos, conferem resistência à meticilina (Stapleton & Taylor 2002).

A origem desta resistência pode estar na importação de genes estranhos à espécie, como no caso do *S. aureus*, onde MRSA e MSSA diferem geneticamente pela presença do gene *mecA* no cromossomo, o qual codifica a PBP2a (76 kDa). A hipótese de origem deste gene de resistência admite sua presença na microbiota comensal que coloniza o homem antes de surgir em um microrganismo patogênico, ainda que este gene tenha sido adquirido primeiramente por um representante dos estafilococos como o *S. epidermidis*. Após pesquisas e estudos em laboratório, o gene de resistência foi relacionado ao *S. sciuri*, que pode ter sido o precursor na cadeia evolutiva que conduziu ao gene de resistência (Lencastre 1999, Stapleton & Taylor 2002).

A aquisição da PBP2a e sua disseminação entre as cepas de *S. aureus* marcou de forma expressiva os mecanismos de resistência que, um após o outro, foram anulando a eficácia de diferentes antibióticos.

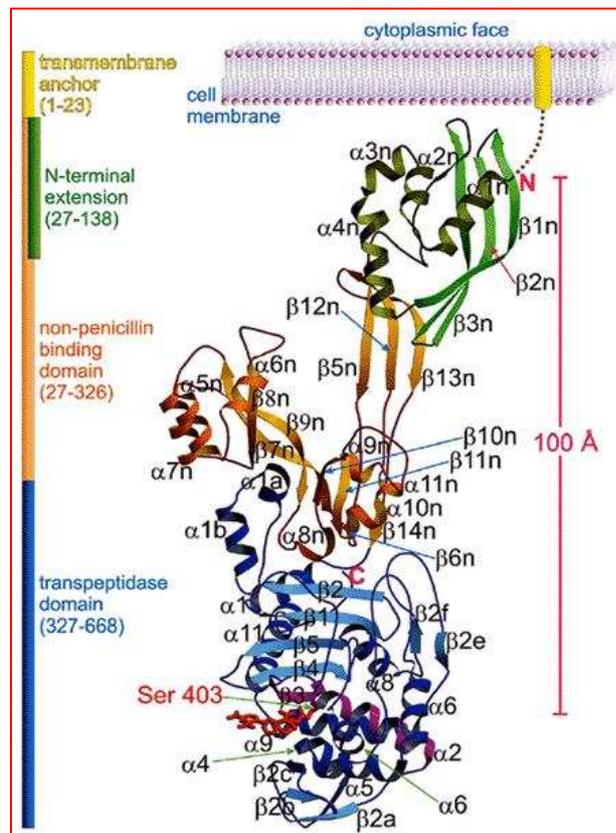


Figura 1.5: Estrutura terciária da PBP2a de *S. aureus*. O domínio bilobular N-terminal nPB está representado em laranja, com o lobo N-terminal (extensão N-terminal) em verde. O domínio transpeptidase está em azul, com a posição do sítio ativo indicado pelo anel nitrocefina, em vermelho. Os elementos da estrutura secundária do domínio transpeptidase foram marcados de acordo com o esquema de marcação usado para a R6 PBP2x (*Streptococcus pneumoniae*). As regiões N e C terminal estão marcadas com N e C, respectivamente. À esquerda da representação em fita, está uma representação linear dos domínios da SauPBP2a, com o número de resíduos mostrados entre parênteses (Lim & Strynadka 2002).

Assim, inúmeros agentes antibacterianos que eram muito úteis na prática clínica acabaram sendo abandonados uma vez que se tornaram ineficazes na cura de novas infecções estafilocócicas (Lencastre 1999). O crescente aumento de cepas resistentes tanto no ambiente hospitalar, como na comunidade (HA-MRSA e CA-MRSA), é consequência do uso indiscriminado dos antimicrobianos os quais têm gerado uma pressão de seleção ao longo dos anos (Chambers & DeLeo 2009).

Logo, a consequência desta pressão de seleção, em conjunto com a transferência de genes, é o surgimento de cepas com resistência intermediária à vancomicina (VISA) cuja concentração mínima inibitória (CMI) é de 4-8 µg/mL. O mecanismo de resistência se dá através do espessamento da parede celular devido a alterações na biossíntese de peptidoglicano (Hiramatsu *et al.* 1997).

Mais recentemente surgiram cepas totalmente resistentes à vancomicina (VRSA) por aquisição do gene *vanA* de *Enterococcus faecalis* resistente à

vancomicina (VRE) que causa alterações no peptídeo terminal (D-Ala-D-Ala). A CMI para VRSA é $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ (Hiramatsu *et al.* 2001, Lowy 2003).

1.3. Métodos laboratoriais de identificação bacteriana e resistência à meticilina/oxacilina em estafilococos

O diagnóstico laboratorial de um agente infeccioso deve ser realizado utilizando métodos de identificação convencionais ou moleculares, de acordo com a relação custo/benefício observada nos parâmetros sensibilidade, rapidez, custo, eficiência e etc. Tais métodos permitem a identificação de microrganismos isolados em amostras clínicas.

Os métodos convencionais submetem a amostra à coloração de Gram, incubação para crescimento das colônias, provas bioquímicas e perfil de suscetibilidade para identificação do agente, enquanto os métodos moleculares identificam o patógeno a partir da amplificação do material genético (Ueno & Jorge 2001).

1.3.1. Métodos convencionais

Na rotina laboratorial em bacteriologia clínica, uma amostra, que pode ser fezes, urina, sangue, líquido cefalorraquidiano e secreções de vias aéreas (escarro), é coletada de paciente suspeito de infecção bacteriana e enviada para análise. A amostra deve ser submetida ao exame bacterioscópico (coloração de Gram) para análise microscópica a fim de determinar características morfo-tintoriais das bactérias presentes (Figura 1.6). Assim, permite-se caracterizar o agente infeccioso em Gram-positivo ou Gram-negativo e obter informações sobre sua morfologia (cocos, bacilos e etc.).

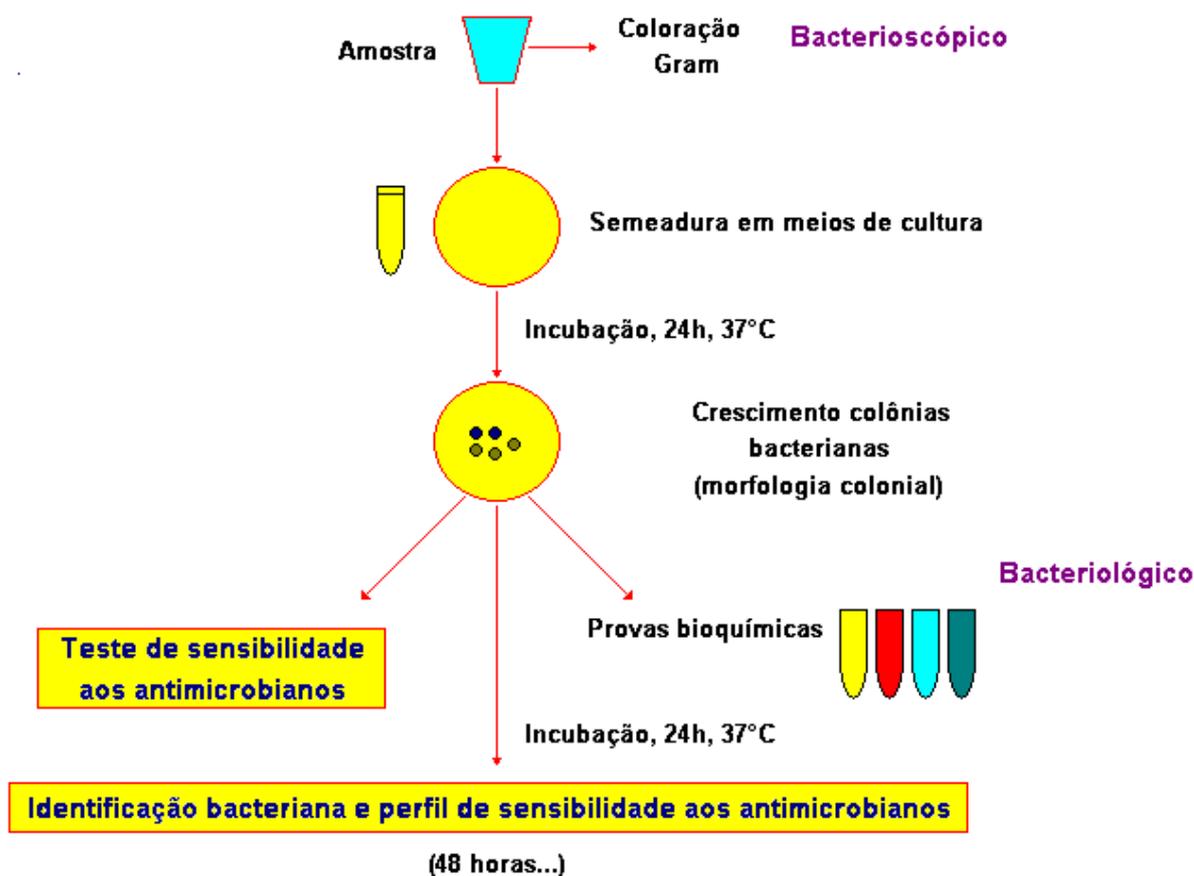


Figura 1.6: Fluxograma geral de identificação bacteriana utilizando métodos de análise convencionais.

Segue-se para semeadura em meios de cultura que podem ser enriquecidos ou seletivos. Os meios enriquecidos favorecem o crescimento de microrganismos fastidiosos, enquanto os meios seletivos permitem selecionar um determinado tipo de bactéria. Alguns destes meios são:

- McConkey para identificação de Gram-negativos;
- Chapman (meio hipertônico) para crescimento de cepas *Staphylococcus*.

Após incubação por 24 horas a 37°C para crescimento das colônias bacterianas, observa-se a morfologia colonial seguindo a identificação baseada no metabolismo bacteriano, utilizando-se provas bioquímicas, enzimáticas e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. As provas bioquímicas utilizam carboidratos e aminoácidos para identificação, as enzimáticas identificam o agente por meio da produção de catalase, coagulase, hemolisinas, etc.

Para teste de suscetibilidade aos antimicrobianos realiza-se o método de difusão em disco para determinar o perfil *in vitro* da bactéria e/ou determinação da CMI por diluição em caldo ou ágar para estudo de fenótipos de resistência. Nestes ensaios, recomenda-se preparar o inóculo utilizando o método de suspensão direta

de colônias, fazendo uma suspensão em caldo ou solução salina, a partir de colônias isoladas selecionadas numa placa de ágar de 16-18 horas (meio não seletivo como ágar sangue).

De acordo com o procedimento padrão adotado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI/NCCLS 2011), para testar possível resistência dos estafilococos à meticilina/oxacilina, deve-se utilizar a oxacilina ou cefoxitina, uma vez que estes fármacos permitem o reconhecimento de sua resistência. Como os estafilococos resistentes à oxacilina são resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos atualmente disponíveis, a sensibilidade ou resistência a um amplo leque de drogas deste grupo pode ser inferida testando apenas penicilina e oxacilina ou cefoxitina.

No teste de difusão em disco, o qual é empregado para detecção rotineira de resistência à oxacilina, o CLSI/NCCLS recomenda a utilização do teste com disco de cefoxitina (30 μ g) o qual é comparável ao teste com disco de oxacilina em termos de prever a resistência à oxacilina mediada pelo gene *mecA*, uma vez que a leitura do teste é facilitada devido ao maior halo e à possibilidade de leitura através de luz refletida (Mimica & Mendes 2007). Neste caso, *S. aureus* cujo halo de inibição de cefoxitina for ≤ 21 mm deve ser relatado como resistente à oxacilina e quando ≥ 22 mm, relatado como sensível à oxacilina.

Segundo a metodologia adotada pelo CLSI/NCCLS (2003), para realizar o teste de diluição em ágar a fim de determinar a CMI de oxacilina, preparam-se várias placas com meio ágar (Mueller-Hinton acrescido de NaCl 2% p/v; 0.34 mol/L) onde são adicionadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, as placas são inoculadas com uma suspensão padrão do organismo a ser testado. Após incubação de 16-20 horas para oxacilina a 33°-35°C, examinam-se os testes e determina-se a CMI. A resistência é definida pela CMI de oxacilina ≥ 4 μ g/mL (CLSI/NCCLS 2011).

Entretanto, é importante ressaltar que estes métodos de diagnóstico necessitam de um tempo mínimo de 48 horas para realização, as bactérias precisam estar viáveis para identificação e determinação do perfil de resistência e o isolamento de colônias puras é fundamental para correta identificação.

1.3.2. Métodos moleculares

Os métodos moleculares para identificação bacteriana podem ser utilizados para determinar a espécie e também estimar mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Como exemplo, podemos citar a reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional. Este método é amplamente utilizado na identificação bacteriana para diagnóstico de doenças infecciosas, tipagem molecular, medicina forense, detecção de mutações e oncogenes e detecção de genes de resistência a drogas.

Para identificação de MRSA podemos citar o PCR-multiplex proposto por Vanuffell *et al.* (1995), o qual identifica o patógeno através da detecção do gene *mecA*, utilizando um conjunto de seqüências iniciadoras, oligonucleotídeos e DNA polimerase, que são capazes de reconhecer e amplificar os fragmentos, os quais são visualizados pela técnica do Brometo de Etídio .

As vantagens deste método de amplificação são rapidez, maior sensibilidade, alta especificidade, a bactéria não precisa estar viável e possibilidade de identificação direta a partir do material clínico. Entretanto, é passível de contaminação cruzada, há necessidade de identificação específica para cada bactéria e requer equipamento especializado e pessoal treinado, elevando os custos e dificultando sua incorporação à rotina de laboratório de bacteriologia de pequeno e médio porte (Fong *et al.* 2000). Desta forma, os métodos moleculares geralmente são empregados a organismos de difícil cultivo e identificação pelos métodos convencionais, como exemplo podemos citar: *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp. e *Legionella maltophilia*.

1.4. Anticorpo monoclonal em imunodiagnóstico

As reações de imunodiagnóstico são baseadas na ligação específica antígeno-anticorpo como forma de detecção. Variam entre simples testes aplicados no campo ou consultório médico até ensaios executados com avançada tecnologia em laboratórios clínicos e bancos de sangue (Stewart *et al.* 2006).

Os anticorpos possuem duas importantes funções: a capacidade de se ligar a antígenos específicos e a possibilidade de ativar células efectoras do sistema imune, como as células *natural killer* (NK) e o sistema complemento. Esta capacidade de

ligação se caracteriza como o elemento-chave no desenvolvimento de ensaios imunológicos padronizados (Nelson *et al.* 2000).

Neste contexto, é importante mencionar o advento da tecnologia de hibridomas, descrita por Georges Köhler e César Milstein em 1975, a qual possibilitou a produção de anticorpos monoclonais específicos para uma grande variedade de epítomos antigênicos, ampliando o emprego de anticorpos em pesquisa e diagnóstico clínico. Com isso, tornou-se crescente o desenvolvimento de testes imunológicos com maior rapidez, precisão, especificidade e sensibilidade (Payne *et al.* 1988).

Os anticorpos monoclonais possuem inúmeras vantagens como: elevada sensibilidade, reprodutibilidade no processo de produção (reatividade e título) e especificidade, as quais possibilitaram sua utilização cada vez maior pela indústria de biotecnologia (Payne *et al.* 1988, Nelson *et al.* 2000). Como exemplos de ensaios que utilizam anticorpos monoclonais, podemos citar: imunoenzimáticos, imunofluorescência, imunocromatografia e aglutinação.

1.4.1. Imunocromatografia de fluxo lateral (*Lateral Flow*)

O teste rápido de fluxo lateral é atualmente empregado no diagnóstico de inúmeras patologias como HIV, diabetes, doenças cardíacas e renais, cuja principal característica é a realização em curto período de tempo, aproximadamente entre 15-20 minutos.

A metodologia do teste rápido de fluxo lateral tem sido uma ferramenta usada no diagnóstico em domicílio, no campo ou em regiões com poucos recursos, permitindo o monitoramento qualitativo, semi-quantitativo e, em alguns casos, quantitativo da amostra. Suas aplicações incluem testes com patógenos, drogas, hormônios e metabólitos distribuídos pelas áreas médica, veterinária e sanitária (Posthuma-Trumpie *et al.* 2009).

A plataforma imunocromatográfica de fluxo lateral é constituída essencialmente por membranas (Figura 1.7). A membrana de nitrocelulose é o local de imobilização da proteína de captura, geralmente um antígeno ou anticorpo. A escolha da membrana varia de acordo com a porosidade e espessura, as quais estão diretamente relacionadas ao fluxo capilar dos reagentes (Walther & Fribe 2008a). As forças de interação estabelecidas entre a molécula de captura e a

membrana (linha teste) é um elemento chave na produção de imunoenaios sensíveis.

A membrana da amostra é o local de impregnação da amostra a ser diagnosticada, permitindo a distribuição desta para a membrana do conjugado. O material é escolhido em conformidade com as propriedades da amostra. Já a membrana do conjugado geralmente contém o conjugado seco e é anexada à membrana da amostra.

A membrana absorvente é geralmente constituída por papel de filtro comum cuja função é absorver tanto os reagentes de revelação quanto a amostra que migraram pelos poros das membranas, a fim de possibilitar melhor visualização das bandas na linha teste e controle, mantendo o fluxo contínuo dos componentes do sistema na plataforma. Quando um absorvente é utilizado, a quantidade de amostra aplicada pode ser maior, o que favorece a sensibilidade do teste (Walther & Fribe 2008b, Posthuma-Trumpie 2009).

Quando a amostra é aplicada, o líquido migra por capilaridade através da membrana do conjugado, reidratando-o, permitindo a interação entre o analito presente na amostra e o conjugado. O complexo formado, analito-conjugado, move-se na membrana em direção à proteína de captura imobilizada, produzindo um sinal. A linha controle indica o correto funcionamento do teste.

A solução tampão auxilia a migração do conjugado e das proteínas contidas na amostra influenciando a taxa de fluxo. Exerce efeito na resposta de sensibilidade e análise final dos resultados, por isso sua composição é definida após sucessivos ensaios.

As vantagens do teste rápido de fluxo lateral incluem o baixo custo, fácil manuseio, o resultado é fornecido em pouco tempo (minutos), pode ser usado em clínicas, laboratórios, no campo ou em casa, e o resultado é de fácil interpretação.

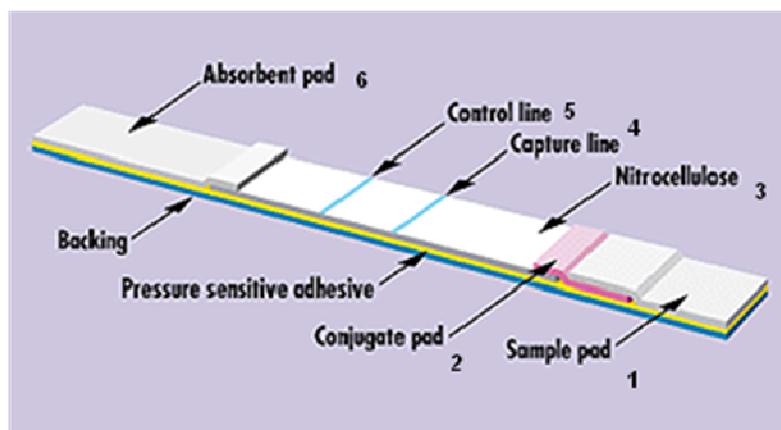


Figura 1.7: Estrutura da plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*. 1) Membrana da amostra (*Sample pad*); 2) Membrana do conjugado (*Conjugate pad*); 3) Membrana de nitrocelulose (*Nitrocellulose*); 4) Linha de captura (*Capture line*); 5) Linha controle (*Control line*); 6) Membrana absorvente (*Absorbent pad*). As membranas acima estão anexadas num cartão (www.devicelink.com.ivdt).

1.5. Processos de conjugação

As reações de conjugação envolvem a ligação entre duas ou mais moléculas a fim de formar um novo complexo com as propriedades combinadas de seus componentes. Tais complexos são empregados rotineiramente em reações para imunodiagnóstico (ELISA, Imunocromatografia, Imunohistoquímica, Western blot e Imuno blot) e desenvolvimento de imunobiológicos (vacinas, biofármacos e adjuvantes) (Brinkley 1992).

No imunodiagnóstico, geralmente as biomoléculas são conjugadas a partículas que contêm marcadores, os quais conferem características específicas às moléculas submetidas ao processo de conjugação, de modo a permitir sua visualização para fins qualitativos e/ou quantitativos. Alguns destes marcadores são enzimas, como a peroxidase de raiz forte (HRP) e fosfatase alcalina (AP); sondas que possuem características intrínsecas como fluorescência, radioatividade ou cromógeno; ouro coloidal que possui coloração variando em função do tamanho da partícula e microesferas funcionalizadas coradas internamente (Brinkley 1992, Hermanson 1996a).

Atualmente, inúmeros métodos de acoplamento entre moléculas biológicas e microesferas são conhecidos e extensivamente empregados para construção de novos conjugados utilizados em ensaios imunológicos. Dentre os métodos podemos destacar a adsorção e o acoplamento covalente (Bangs Laboratories 2008a).

O mecanismo de adsorção baseia-se na interação hidrofóbica (forças de *van der Waals*) entre o ligante a ser adsorvido e a superfície da microesfera. No caso das imunoglobulinas, a porção F_c é mais hidrofóbica, portanto, é mais facilmente adsorvida quando comparada à porção F_{ab} , favorecendo a ligação das proteínas em sua orientação ativa biologicamente. Além disso, a adição do ligante em excesso (3-10x) previne a orientação incorreta, assegurando a estequiometria favorável (Figura 1.8). Já no caso dos ligantes com baixa hidrofobicidade, o acoplamento se dá via interação iônica, podendo acarretar a dissociação do ligante se houver mudanças nas condições do meio reacional e pH, diferentemente do acoplamento somente via interação hidrofóbica.

Geralmente, a adsorção máxima ocorre próximo ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, levando à análise criteriosa do tampão de acoplagem. Para obter máxima cobertura da superfície das esferas, o ideal é utilizar tampão com pH ligeiramente básico, o qual se assemelha ao pI das IgG's, como por exemplo, tampão Tris (pH 8,0) e tampão fosfato (pH 7,4) (Bangs Laboratories 2008a).

Já o acoplamento covalente baseia-se na ligação covalente entre microesferas funcionalizadas e grupamentos da proteína a ser imobilizada. Há uma série de compostos químicos que podem ser utilizados para modificar ou ligar o grupo reativo da microesfera à biomolécula. Tais reagentes podem ser usados para ativar grupos que exibem baixa reatividade em meio aquoso, como por exemplo, carbodiimida para reação com grupamento carboxílico (COOH), ou para ligar grupos que são não-reativos, por exemplo, NH_2/NH_2 . Há também alguns que funcionam como espaçadores, muitas vezes utilizados no acoplamento de moléculas pequenas ou oligonucleotídeos, diminuindo os efeitos estéricos (Bangs Laboratories 2008b).

Ainda que a adsorção tenha mostrado ser um método adequado de acoplagem entre imunoglobulinas e microesferas, o acoplamento covalente é geralmente empregado em casos de utilização de microesferas muito pequenas (<100 nm), moléculas hidrofílicas ou que não podem desorver ao longo do tempo e introdução de reagentes homo/hetobifuncionais para facilitar o acoplamento. (Bangs e Meza 1995).

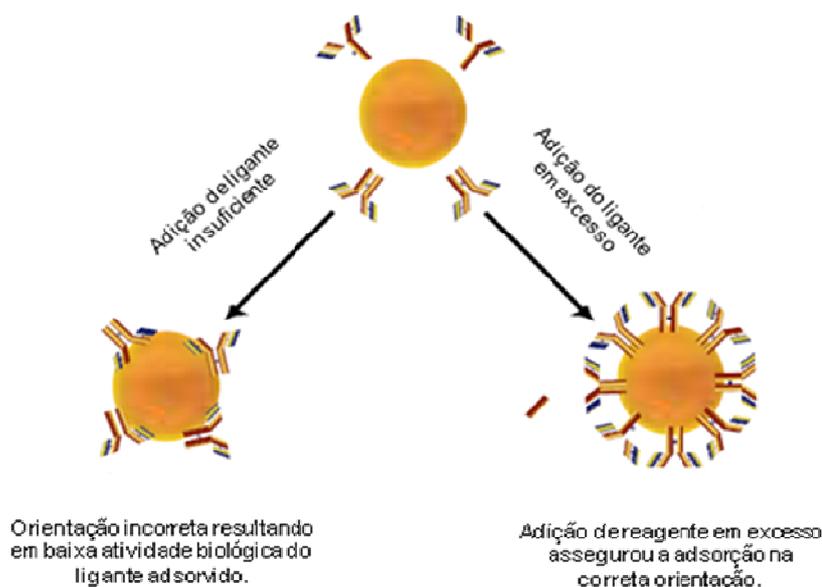


Figura 1.8: Ilustração das possíveis orientações de ligação entre IgG's e microesferas (Bangs Laboratories 2008a).

Outro processo de conjugação envolve a marcação de macromoléculas com partículas de ouro, cuja corrente teórica mais aceita descreve que o complexo proteína-ouro depende das interações: eletrônica (entre partículas de ouro negativamente carregadas e regiões de carga positiva das proteínas), adsorção (regiões hidrofóbicas da proteína e o metal), acoplamento covalente (ligação covalente entre o ouro e grupos funcionais da proteína, como o grupo sulfidril) (Hermanson 1996b).

Entretanto, a escolha das microesferas funcionalizadas coradas internamente para as reações de conjugação foi baseada em fatores como, por exemplo, a facilidade apresentada em definir padrões de multi-bandas coloridas, a possibilidade de aumentar a sensibilidade do teste através do emprego de microesferas fluorescentes e ainda a facilidade na condução dos processos de conjugação.

1.6. Importância do diagnóstico clínico

Como cepas MRSA estão envolvidas em infecções e surtos nosocomiais em todo o mundo, apresentando resistência a uma gama de antimicrobianos, a rápida e correta identificação é fundamental a fim de promover o tratamento e controle da infecção, evitando a progressão de bacteremias ou infecções locais para um quadro de septicemia. A identificação em casos de infecções por cepas MSSA também é

crucial, já que em casos de sensibilidade confirmada, inicia-se o tratamento com antibióticos β -lactâmicos como a oxacilina, os quais são razoavelmente bem absorvidos e causam menor número de efeitos adversos se comparado aos demais antimicrobianos (Katzung 2005), além de serem fármacos de baixo custo. Neste caso, o uso inadequado pode favorecer a seleção de organismos resistentes, colaborando com a diminuição das opções terapêuticas disponíveis.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliação do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a na plataforma imunocromatográfica de fluxo lateral para detecção de resistência à metilina em amostras de *Staphylococcus aureus*.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o anticorpo monoclonal anti-PBP2a;
- Conjugar o anticorpo monoclonal anti-PBP2a a microesferas coradas utilizando os processos de adsorção e acoplamento covalente, descritos na literatura;
- Padronizar o conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a para utilização na plataforma imunocromatográfica de fluxo lateral;
- Testar o conjugado na plataforma imunocromatográfica de fluxo lateral utilizando cepas bacterianas conhecidas de MRSA, MSSA e *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo (SCN).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos em Bio-Manguinhos, na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) e no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER).

3.1. Obtenção do anticorpo monoclonal anti-PBP2a

O anticorpo monoclonal anti-PBP2a, obtido a partir do sobrenadante de cultura de células clone 38 (90/DA5/CB5/AA3 hibridoma 77), foi fornecido pelo Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM) localizado na VDTEC de Bio-Manguinhos.

A obtenção dos anticorpos foi realizada de acordo com a técnica de hibridomas descrita por Köhler e Milstein (1975). Foram utilizados camundongos Balb/C, fêmeas, de 4 a 8 semanas, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ e mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) em Bio-Manguinhos, para os ensaios de imunização e de proteção *in vivo*.

Os camundongos receberam uma dose inicial do plasmídeo pCI-Neo que contém o fragmento do gene *mecA* de MRSA (Senna *et al.* 2003) e, após 14 dias, uma dose de 10 µg de proteína recombinante purificada, correspondente a uma região interna da PBP2a de MRSA conforme descrito por Roth *et al.* (2006), emulsificada em adjuvante de Freund completo, seguida, 14 dias depois por outra dose, emulsificada em adjuvante de Freund incompleto. Quatorze dias mais tarde o animal que apresentou melhor resposta imune, avaliada por ensaio imunoenzimático (ELISA), recebeu uma dose intravenosa de 10 µg de proteína purificada diluída em tampão fosfato de sódio (PBS). Três dias após a injeção intravenosa, o animal foi submetido à eutanásia por asfixia em gás carbônico (CO₂) (Protocolo CEUA L0009-07 - FIOCRUZ) e o baço foi assepticamente removido para a fusão celular. O soro do animal que apresentou melhor resposta imune foi utilizado como controle positivo para os demais testes imunológicos.

Os linfócitos retirados do baço foram submetidos à fusão com células de mieloma SP2/0, empregando polietilenoglicol para a fusão, cultivadas em meio hipoxantina-aminopterin-timidina, a 37°C em atmosfera de CO₂ a 10%, conforme protocolo para produção de anticorpos monoclonais em *Current Protocols in Immunology* (Yokoyama 1995). Os hibridomas resultantes foram avaliados após 14 dias por ELISA, empregando a proteína recombinante purificada como antígeno. Os hibridomas que mostraram resultados satisfatórios foram submetidos à clonagem, com seleção dos melhores clones (ELISA), sendo estes armazenados em nitrogênio líquido.

O anticorpo monoclonal anti-PBP2a, conforme descrito, foi desenvolvido em Bio-Manguinhos, na Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), vinculado ao Programa de Biofármacos e atualmente é protegido pela patente n° WO/2011/017791, a qual reivindica sua aplicação em estudos de imunoterapia e imunodiagnóstico.

3.1.1. Purificação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a

O sobrenadante de cultura de células contendo o anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi submetido à cromatografia por afinidade utilizando a coluna *Hitrap Mab Select Sure* 5 mL (GE Healthcare) no sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) *AKTA Purifier* 10 (GE Healthcare). Inicialmente, foram adicionados 10 volumes de tampão de ligação fosfato de sódio 20 mM; NaCl 0,15 M; pH 7,2 para equilibrar a coluna. Após passagem da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de ligação e, em seguida, a amostra foi eluída em gradiente linear citrato de sódio 0,1 M; pH 3,5. As frações retiradas foram adicionadas de 100 µL de Tris-HCl 1 M; pH 9,0.

3.1.2. Análise do sobrenadante de cultura de células e das frações purificadas

O sobrenadante de cultura de células e as frações purificadas foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, utilizando o sistema Mini-Protean III (Bio-Rad), segundo Laemmli (1970), para avaliar a presença da banda referente à imunoglobulina antes e após o processo de purificação. O padrão de peso molecular utilizado foi *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad)

catalog. 161-0324. O gel foi revelado utilizando solução corante composta de *Coomassie brilliant blue* R-250 0,2% na mistura de metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v). A solução descorante utilizada foi metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v) renovando-se a solução até completa visualização das bandas (Neuhoff *et al.* 1985).

3.1.3. Diálise das frações purificadas

As amostras isoladas da purificação contendo o anticorpo monoclonal anti-PBP2a foram submetidas à diálise, para retirar o excesso de sal, utilizando a membrana Slide-A-Lyzer[®] 10,000 (Thermo Scientific), a 4°C. A solução tampão utilizada foi PBS 0,05x pH 7,4; trocada 4 vezes em 24 horas.

3.1.4. Concentração das amostras

As frações cromatográficas contendo o anticorpo monoclonal anti-PBP2a foram concentradas por liofilização (liofilizador L101 – LIOTOP), a fim de obter pequenos volumes para emprego na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*.

3.1.5. Caracterização físico-química do anticorpo monoclonal anti-PBP2a

A) Quantificação de proteínas

A quantificação segue o protocolo de dosagem de proteínas pelo método de Folin - Lowry modificado, proposto por Peterson *et al.* (1983). O padrão usado foi albumina de soro bovino (BSA).

B) Determinação do peso molecular

O peso molecular foi calculado a partir da mobilidade eletroforética da imunoglobulina por SDS-PAGE segundo Laemmli (1970), utilizando gel pré-moldado com gradiente de concentração 8-25% no sistema PhastSystem (GE Healthcare). Foi aplicado 4 µg da imunoglobulina anti-PBP2a tratada com o agente redutor Ditioneitol (DTT) para quebrar as cadeias da imunoglobulina e 4 µg da

imunoglobulina não tratada. O padrão de peso molecular usado foi *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad) catalog 161-0324. O gel foi revelado com solução corante *Coomassie brilliant blue R-250* 0,2% na mistura de metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v). A solução descorante utilizada foi metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v). A análise foi realizada no programa *Image Master* (GE Healthcare).

C) Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico (pI) foi estimado por focalização isoelétrica da imunoglobulina em gel de poliacrilamida IEF-PAGE segundo Vesterberg (1969) e Pharmacia Biotech (1990a), utilizando gel pré-moldado com gradiente de pH 3-9 no sistema PhastSystem (GE Healthcare). Foi utilizada a mistura de padrões de pI 3 a 9 *Broad* (GE Healthcare). Foi aplicado 4 µg de imunoglobulina no gel, o qual foi revelado com solução PlusOne™ Silver Staining Kit, Protein (GE Healthcare) segundo Heukeshoven (1985). A análise foi realizada no programa *Image Master* (GE Healthcare).

D) Análise da homogeneidade protéica

A homogeneidade foi verificada através de eletroforese nativa em gel de poliacrilamida (NATIVE-PAGE) segundo Pharmacia Biotech (1990b) utilizando gel *pre-cast* com gradiente de concentração 8-25%, no sistema PhastSystem (GE Healthcare). Foi aplicado 4 µg da imunoglobulina anti-PBP2a e o gel revelado com solução corante composta de *Coomassie brilliant blue R-250* 0,2% na mistura de metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v). A solução descorante utilizada foi metanol : ácido acético : água (30% :10% :60%, v/v/v). A análise foi realizada no programa *Image Master* (GE Healthcare).

3.1.6. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a por imunoenensaio enzimático (ELISA)

A atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi avaliada por ELISA segundo Senna *et al.* (2003). Para o ensaio foi utilizada microplaca NUNC Maxisorp™ onde foi adicionada 0,25 µg/poço da proteína recombinante purificada

PBP2a diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0. Após incubação *overnight* a 4°C para adsorção do antígeno, foram efetuadas 3 lavagens com PBS-T (solução tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% pH 7,2). Em seguida, foi realizado o bloqueio com 200 µL/poço de PBS-*milk* 5% (solução tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 150 mM, leite desnatado 5%) e a reação incubada a 37°C por 2 horas. Após incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e efetuadas 3 lavagens com PBS-T.

O anticorpo monoclonal anti-PBP2a purificado (1 mg/mL) foi diluído 1:10 em PBS-*milk* 5% e adicionado 100 µL/poço, procedendo à diluição seriada, cujas concentrações variam entre 100 ng e 24 pg. A reação foi novamente incubada a 37°C por 2 horas e após 3 lavagens com PBS-T, foi adicionado 100 µL/poço da imunoglobulina anti-mouse conjugada HRP (Promega), diluída 1: 5000 em PBS-*milk* 5%. Após incubação de 90 minutos a 37°C, foram realizadas 3 lavagens com PBS-T e o cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina 1%, Bio-Rad) foi adicionado (100 µL/poço), incubando por 10-15 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N e as densidades óticas determinadas a 450 nm em leitor de microplacas SUNRISE™ (Tecan).

3.2. Processos de conjugação: microesferas coloridas x Mab anti-PBP2a

3.2.1. Quantificação das microesferas

A suspensão que contém as microesferas Estapor® K1-030 *rouge* C1 B9 lote 734 grupamento -COOH (MERCK), foi quantificada através da pesagem de diferentes alíquotas. Foram adicionados volumes de 20, 40, 60, 80 e 100 µL da suspensão em tubos de 2 mL, deixados *overnight* a 37°C. O peso seco das microesferas foi comparado ao valor informado pelo fabricante.

3.2.2. Acoplamento covalente

No processo de conjugação, as microesferas foram inicialmente lavadas (2x) com tampão fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) 10 mM e diluídas para concentração final de 1%. O tampão de acoplamento (tabela 3.1) foi adicionado e a reação incubada por 15 minutos, sob agitação, à temperatura ambiente (TA). Após ativação do grupo funcional, as esferas foram lavadas (2x) com fosfato de sódio

dibásico (Na_2HPO_4) 20 mM e ressuspensas em tampão C (NaH_2PO_4 0,2 M; Na_2HPO_4 20 mM). A imunoglobulina foi adicionada e a reação incubada, sob agitação, durante 2-3 horas TA. Após acoplagem, as esferas foram novamente lavadas (3x) com tampão C e ressuspensas em tampão de bloqueio (Na_2HPO_4 20 mM, Glicina 100 mM, BSA 5%, Azida Sódica 0,02%) pH 7,5 (Bangs Laboratories 2008b). Durante as lavagens, foram utilizados o vortex e sonicador para homogeneizar a solução e desfazer os grumos formados, respectivamente.

Tabela 3.1: Reativos utilizados no processo de conjugação pelo método do acoplamento covalente.

<i>Beads K1-030 blue A1 lote 734</i>	<i>Diâmetro</i>	<i>Conc. inicial de esferas</i>	<i>Conc. de Mab anti- PBP2a (mg /mL)</i>	<i>Tampão de acoplagem</i>
Grupamento -COOH	0,3 μm	10%	0,2 mg	Carbodiimide HCl 50 mM N-Hydroxysuccinimide 30 mM NaH_2PO_4 10 mM

3.2.3. Adsorção passiva

No processo de adsorção, as microesferas foram inicialmente lavadas (3x) com tampão de acoplagem (tabela 3.2) e diluídas para concentração final de 1%. A imunoglobulina foi adicionada e a reação incubada, sob agitação, durante 2-3 horas TA. Após adsorção, a solução foi novamente lavada (3x) com tampão de acoplagem e as esferas ressuspensas em tampão de bloqueio (Glicina 100 mM, Tris-HCl 50 mM, BSA 5% e Azida Sódica 0,02%) pH 8,0; incubadas por 30 minutos, sob agitação (Bangs Laboratories 2008a). Durante as lavagens, foram utilizados o vortex e sonicador para homogeneizar a solução e desfazer os grumos formados, respectivamente.

Tabela 3.2: Reativos utilizados no processo de conjugação pelo método de adsorção passiva.

<i>Beads K1-030 blue A1 lote 734</i>	<i>Diâmetro</i>	<i>Conc. inicial de esferas</i>	<i>Conc. de Mab anti- PBP2a (mg /mL)</i>	<i>Tampão de acoplagem</i>
Grupamento -COOH	0,3 μm	10%	0,2; 0,5; 1 e 2,8 mg	PBS pH 7,2

3.2.4. Caracterização do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a

A estimativa da quantidade de imunoglobulina anti-PBP2a acoplada às partículas após o processo de conjugação pode ser determinada usando o método

de subtração baseado na absorvância da imunoglobulina a ser acoplada (DO 280 nm) e absorvância do sobrenadante que contém imunoglobulina não acoplada (DO 280 nm) (Bangs Laboratories 2008a).

Para tal, as seguintes soluções foram mensuradas no espectrofotômetro:

- Imunoglobulina pura diluída 1:4;
- Sobrenadante de microesfera conjugada 0,25 mg/mL diluído 1:2.

A faixa de leitura variou entre 200 a 600 nm e os valores calculados de acordo com a fórmula abaixo:

$$C = ABS_{280\text{ nm}} \times F_{\text{dil.}} / \epsilon$$

Onde,

C = Concentração;

ABS = Absorvância;

F_{dil.} = Fator de diluição;

ϵ = Coeficiente de extinção (mg/mL).

3.2.5. Avaliação do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a por *Lateral Flow*

A) Ensaio direto

No ensaio direto, a membrana de nitrocelulose (18 cm de comprimento) foi impregnada com 3,6 μg e 13,6 μg da proteína recombinante purificada PBP2a. As demais membranas foram adicionadas (Figura 3.1) e o cartão cortado em fitas de 5,5 mm de largura. Foram aplicados no suporte de teste os volumes de 5 μL (2,5 μg) do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a 0,5 mg/mL e 3 gotas de tampão.

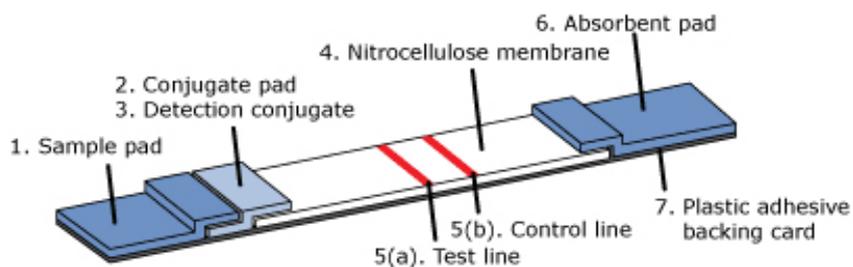


Figura 3.1: Componentes da plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* (www.rapid-diagnostics.org).

B) Ensaio indireto

No ensaio indireto, a membrana de nitrocelulose (18 cm de comprimento) foi impregnada com 10 µL do anticorpo monoclonal anti-PBP2a (0,5; 1,0; 1,4 e 3,0 mg/mL) e as demais membranas foram adicionadas. O cartão foi cortado em fitas de 5,5 mm de largura. Foram aplicados no suporte de teste os volumes de 5 µL (2,5 µg) ou 10 µL (5 µg) do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a 0,5 mg/mL juntamente com 3,6 µg da proteína recombinante purificada PBP2a e 3 gotas de tampão. O ensaio para controle positivo do teste foi empregado com a adição de todos os reativos citados acima, exceto a proteína purificada.

3.3. Avaliação imunológica de células MRSA, MSSA e *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo (SCN)

3.3.1. Cultivo de células MRSA, MSSA e SCN

A) Meio sólido:

A placa contendo meio de cultura Luria - Bertani (LB) (10 g/L bacto-triptona, 5 g/L extrato de levedura, 10 g/L NaCl e 15 g/L de ágar) foi semeada a partir das amostras congeladas a - 70°C, em glicerol 30%. No caso de MRSA, o meio LB deve conter 25 µg/mL de oxacilina. A semeadura foi feita por esgotamento, com o objetivo de obter colônias isoladas puras. A placa foi incubada a 37°C *overnight*. Após crescimento, 3 a 5 colônias foram retiradas com alça bacteriológica estéril (10 µL) e solubilizadas em 50 µL de tampão PBS pH 7,2.

B) Meio líquido:

A partir de colônias em placa, 3 a 5 colônias foram removidas com alça bacteriológica estéril (10 µL) e inoculadas em caldo LB, incubando a 37°C *overnight*, sob agitação. Para cultura em fase exponencial, deixar agitando por 3 a 4 horas até turvação consistente ($DO_{600} \sim 0,6$ a $0,8$ possui aproximadamente 10^8 bactérias/mL). No caso de MRSA, foi adicionado oxacilina na concentração final de 25 µg/mL. Após crescimento, uma alíquota de 1 mL das culturas em caldo foi centrifugada a 9300 g

por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (*pellet*) foi ressuspensão em 50 µL de tampão PBS pH 7,2.

3.3.2. Amostras de células MRSA, MSSA e *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo (SCN)

As amostras empregadas nos ensaios imunológicos (tabela 3.3) foram avaliadas no estado íntegro e lisado, cujo tratamento de lise foi a adição de Lisostafina (Sigma) 5 U/mL de cultura e Benzonase® Nuclease (Novagen) 5 U/mL de cultura, seguidas de incubação em banho de água a 37°C por 30 minutos.

Tabela 3.3: Amostras de células MRSA, MSSA e SCN empregadas nos ensaios imunológicos.

Cepas	Origem	Procedência
MRSA	COL (1º genoma de MRSA seqüenciado)	Instituto Pasteur
MRSA <i>mecA</i> -	COL (<i>mecA</i> knockout)	Instituto Pasteur
MSSA	Amostra ATCC® (<i>American Type Culture Collection</i>) 25923	Hospital Pronto-Socorro de Porto Alegre
SCN <i>mecA</i> -	Amostra clínica de <i>Staphylococcus xyloso</i> isolada de cão	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

3.3.3. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a contra células íntegras MRSA e SCN por ELISA

A atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi avaliada por ELISA seguindo as condições descritas no item 3.1.6 com as seguintes modificações: Foram adicionados 100 µL/poço das amostras MRSA COL (*mecA* +), MRSA COL (*mecA* -) e SCN (*mecA* -) cultivadas em meio líquido contendo aproximadamente 10⁸ bactérias/mL, cujo *pellet* (1 mL) foi lavado em PBS pH 7,2 e diluído 1:10 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0. A imunoglobulina anti-PBP2a purificada foi aplicada nas concentrações de 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 µg/poço e o conjugado anti-mouse HRP (Promega), diluído 1: 10.000.

3.3.4. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a contra células íntegras MRSA e MSSA por microscopia

Para avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a por microscopia, foram adicionados 10 µL do meio LB contendo amostras MRSA e MSSA (aproximadamente 10^7 bactérias/mL) em tubos de 1,5 mL com 10 µg da imunoglobulina anti-PBP2a e a solução incubada a 37°C por 4 horas, homogeneizando suavemente a cada hora. Em lâmina de vidro, foi feito esfregão com 10 µL das amostras incubadas, os quais foram secos em estufa a 37°C. As amostras foram coradas pelo método de Gram (Madigan *et al.* 2003) e observadas em imersão no aumento de 100x.

3.4. Ensaio com células MRSA e MSSA por *Lateral Flow* utilizando o conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a

3.4.1. Impregnação das membranas com o anticorpo monoclonal anti-PBP2a

O anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi impregnado na membrana de nitrocelulose (MN) pela AUTOMATIC TLC SAMPLER 4 (CAMAG) na velocidade de 210 nL/s. Após ser impregnada, a membrana foi levada à estufa (37°C) durante 1 hora. A MN foi anexada ao cartão (18 cm de comprimento) e as demais membranas acrescentadas, como a membrana do conjugado (MC), membrana da amostra (SP) e membrana absorvente (MA). Após montagem, o cartão foi cortado em tiras com espessura de 5,5 mm na MATRIX™ 2360 (KINEMATIC AUTOMATION). Em seguida, a fita foi adicionada ao suporte de teste.

Os volumes do anticorpo monoclonal anti-PBP2a impregnado variam entre 10 e 20 µL nas diferentes concentrações 0,5; 1,0; 1,4 e 3,0 mg/mL. As membranas utilizadas estão descritas a seguir:

1) Membranas de Nitrocelulose (MN)

- Immunopore SP 3 µm Whatman® GE Healthcare (MN W);
- Vivid™ 170 PALL Life Sciences (MN Viv);
- 150 CNPH-N-SS40 MDI Advanced Microdevices PVT (MN 150).

2) Membrana da amostra (SP)

- Papel de filtro comum (tratado) (SP).

3) Membrana do conjugado (MC)

- Conjugate pad grade 8975 PALL (Life Sciences) (MC 8975);
- Conjugate pad grade 6613 Ahlstrom (MC 6613).

As membranas do conjugado foram submetidas a tratamento com tampão de bloqueio (Fosfato de sódio monobásico 1,93 g/L; fosfato de sódio dibásico 5,11 g/L; BSA 5 g/L; Azida Sódica 1 g/L; Triton X-100 1 mL) pH 7,2.

4) Membrana absorvente (MA)

- Papel de filtro comum (sem tratamento) (MA).

3.4.2. Soluções tampão testadas na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*

Foram adicionadas 3 gotas da solução tampão ao suporte de teste, após aplicação da amostra e conjugado. Seguem abaixo as soluções utilizadas na plataforma imunocromatográfica:

- Tampão PBS pH 7,2;
- Tampão PBS Tween 20 0,05%;
- Tampão *Lateral Flow* (Teste rápido HIV 1/2 Bio-Manguinhos);
- Tampão *Dual Path Plataform* (DPP) Leptospirose;
- Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; Triton X-100 1%; BSA 1% e EDTA 1 mM (Tampão 1);
- Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NP 40 1%; BSA 1% e EDTA 1 mM (Tampão 2);
- Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NP 40 1%; Desoxocolato de sódio 0,25% e EDTA 1 mM (Tampão 3);
- Tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; NP 40 1%; BSA 1%; EDTA 1 mM e Sacarose 2% (Tampão 2 + sacarose 2%).

4. RESULTADOS

4.1. Anticorpo monoclonal anti-PBP2a

A fusão das células para obtenção do hibridoma 77 foi realizada pelo LATAM o qual forneceu o sobrenadante de cultura de células contendo o anticorpo monoclonal anti-PBP2a para purificação, avaliação, conjugação e utilização na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*.

4.1.1. Purificação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a e análise das frações purificadas

O sobrenadante de cultura de células foi submetido à purificação por cromatografia de afinidade em coluna *Hitrap Mab Select Sure*, conforme observado pelo pico principal na figura 4.1. Após eluição, as frações contendo o anticorpo monoclonal anti-PBP2a (23 a 29 mL) foram dialisadas, concentradas por liofilização e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (Figura 4.2a), cuja curva de calibração apresentou R^2 de 0,9934 (Figura 4.2b).

A análise eletroforética das frações purificadas evidenciam a presença das bandas relativas à imunoglobulina G (IgG), as quais estão localizadas em aproximadamente, 25 kDa e 50 kDa, correspondendo às cadeias leves e pesadas, respectivamente. A fração sobrenadante (coluna 2) contém as bandas referentes à IgG, entretanto, a análise densitométrica prevê uma banda principal cujo peso molecular está em torno de 74 kDa (Figura 4.2c), sugerindo a presença de proteínas no meio, como a albumina.

As frações compreendidas entre as colunas 3 e 9 apresentam bandas somente nas regiões correspondentes à IgG, representadas pela figura 4.1d (coluna 6). A análise no *Image Master* permitiu o cálculo do peso molecular médio das cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal anti-PBP2a, ambas em torno de 26 kDa e 54 kDa, respectivamente.

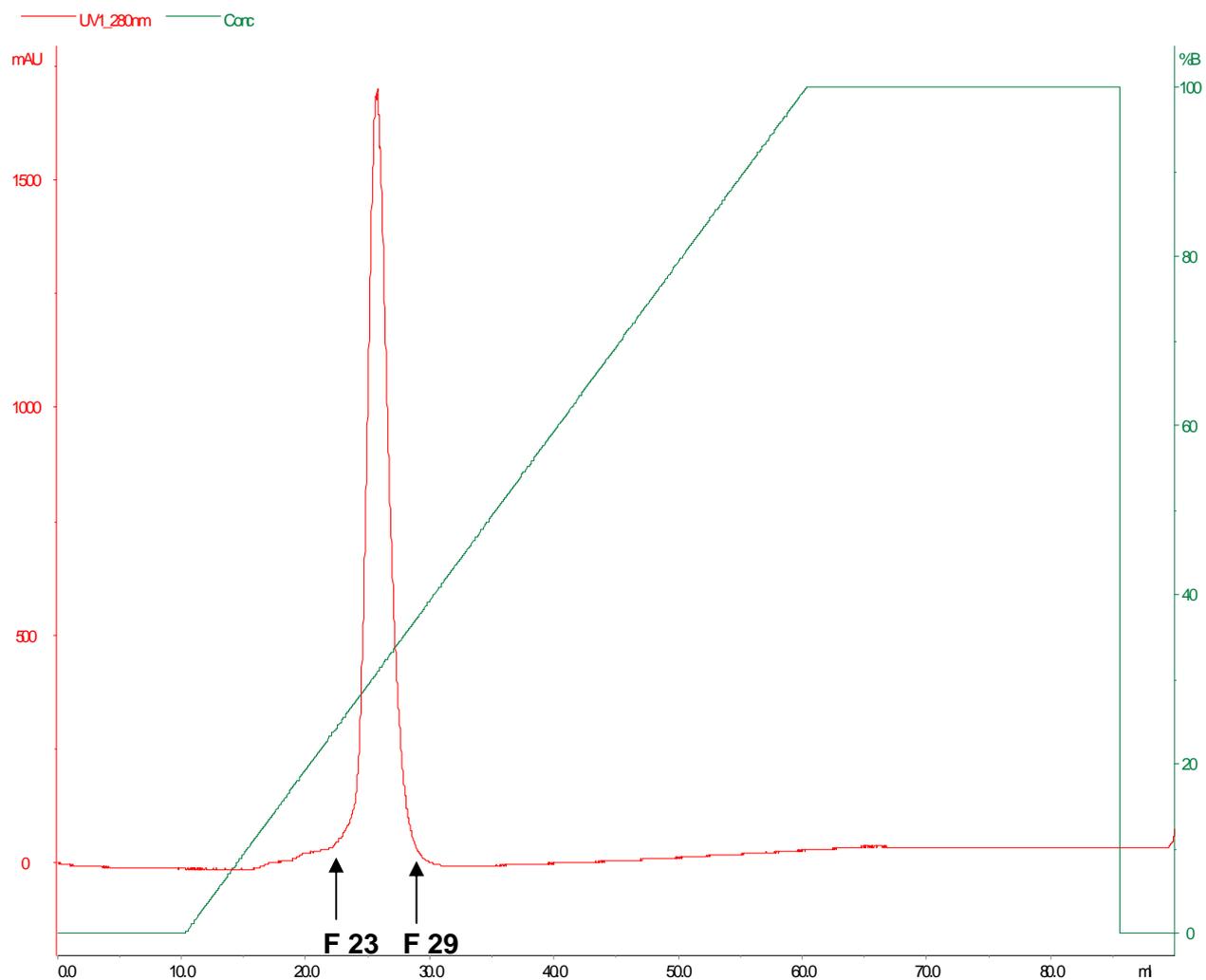


Figura 4.1: Perfil cromatográfico do sobrenadante de cultura de células clone 38, hibridoma 77, lote 04/2009 fornecido pelo LATAM. A eluição das frações foi feita em gradiente linear citrato de sódio 0,1 M; pH 3,5. As setas indicam o conjunto das frações purificadas contendo o anticorpo monoclonal anti-PBP2a (23 a 29 mL).

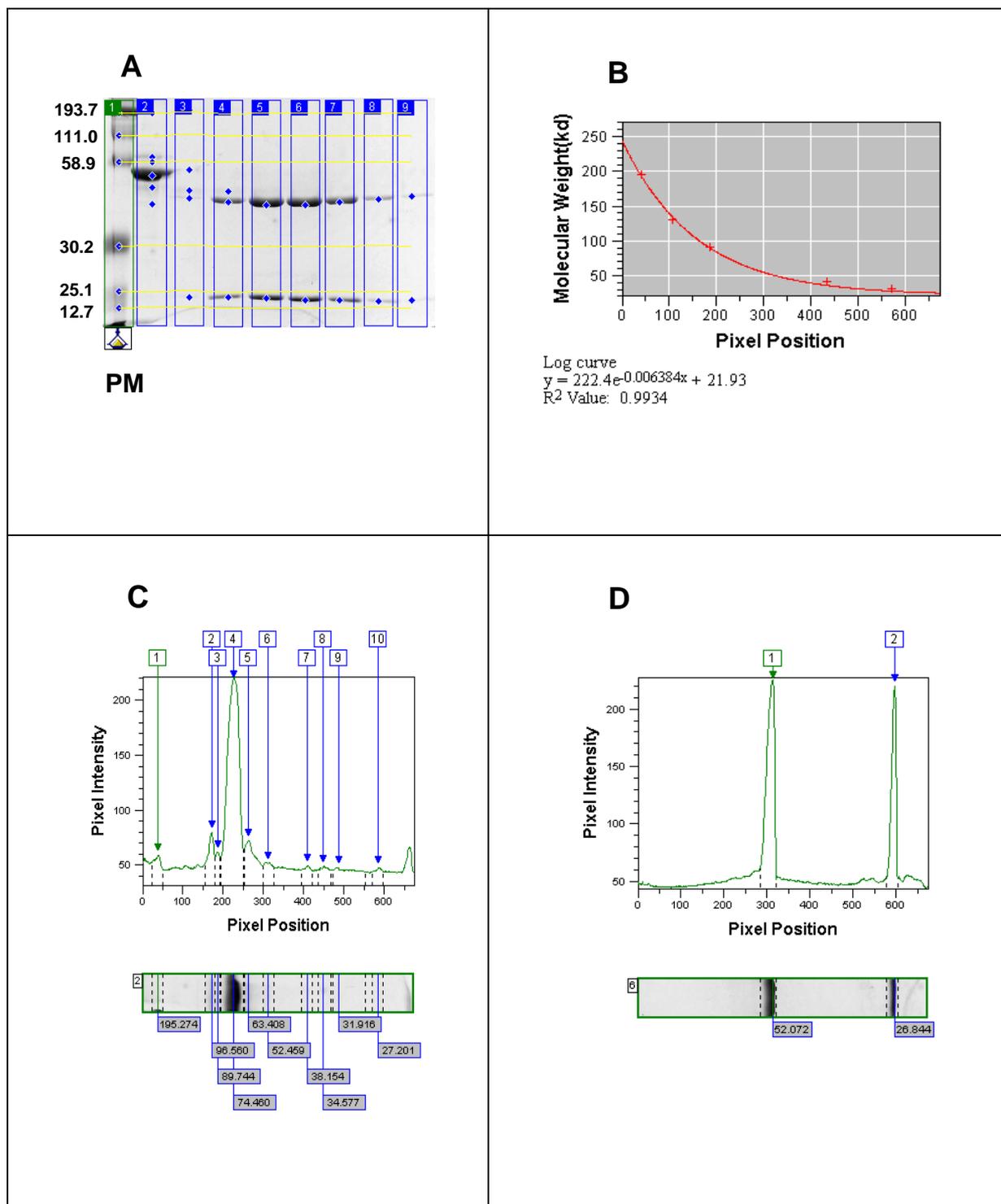


Figura 4.2: Análise do sobrenadante de cultura de células e das frações purificadas no programa *Image Master*. A) Eletroforese SDS-PAGE 12% das frações isoladas da purificação. Coluna 1: padrão de peso molecular (PM); coluna 2: sobrenadante (SBN); colunas 3 a 9: frações selecionadas (23 a 29 mL). B) Curva de calibração das amostras migradas no gel de acordo com o padrão de peso molecular. C) Eletroforetograma e análise densitométrica da fração SBN. D) Eletroforetograma e análise densitométrica da fração purificada 26 (coluna 6).

4.1.2. Caracterização físico-química do anticorpo monoclonal anti-PBP2a

A) Quantificação protéica

A curva padrão determinada para quantificação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a está representada na figura 4.3. O gráfico mostra a relação entre as diferentes concentrações de proteína (BSA) em função da densidade ótica. O cálculo da concentração final da imunoglobulina anti-PBP2a é dado pela equação da reta e os valores encontram-se indicados abaixo:

- Lote 04/2009 (23/11/2009): 1,4 mg/mL
- Lote 04/2009 (13/05/2010): 3,0 mg/mL
- Lote 04/2009 (05/08/2010): 0,5 mg/mL
- Lote 04/2009 (03/03/2011): 1,0 mg/mL

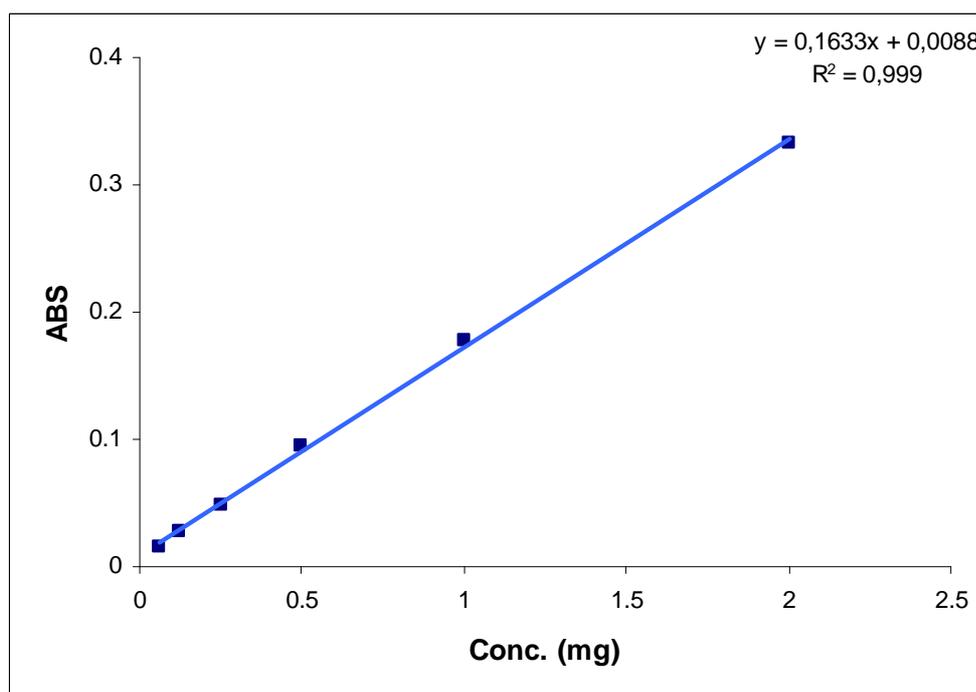


Figura 4.3: Curva padrão de BSA adicionado nas concentrações de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A reação foi revelada com os reagentes A e B seguindo protocolo de dosagem de proteínas pelo método de Folin-Lowry modificado (Bio-Rad).

B) Determinação do peso molecular

O peso molecular nativo determinado para o anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi 162 kDa. Como foi adicionada grande quantidade de amostra, a fim de confirmar a ausência de contaminantes, tais bandas não ficaram corretamente caracterizadas (Figura 4.5a - colunas 2 e 4).

A curva de calibração do gel nativo apresentou R^2 de 0,9935 (Figura 4.5b) e o peso molecular foi calculado com base na análise densitométrica das colunas 3 e 5, a partir do somatório das médias obtidas das cadeias leve e pesada da amostra tratada com DTT (Figura 4.5c e 4.5d).

C) Determinação do ponto isoelétrico

De acordo com a focalização isoelétrica, a amostra do anticorpo monoclonal anti-PBP2a, aplicada em triplicata, apresentou 3 isoformas com ponto isoelétrico variando entre 6,85 a 7,35 quando analisada pelo programa *Image Master* (colunas 2, 3 e 4, ver seta, figura 4.4).

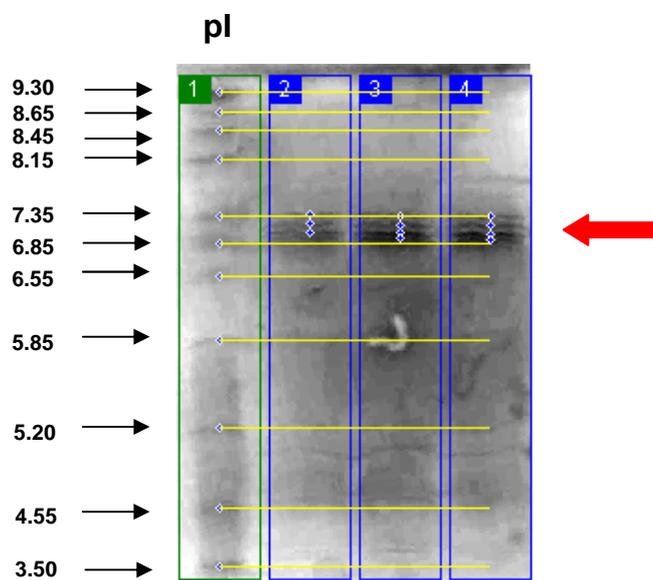


Figura 4.4: Focalização isoelétrica do Mab anti-PBP2a em gel de poliacrilamida IEF-PAGE gradiente de pH 3-9 analisada no programa *Image Master*. Coluna 1: padrão de ponto isoelétrico (pI); colunas 2 a 4: 4 μ g do anticorpo monoclonal anti-PBP2a (ver seta).

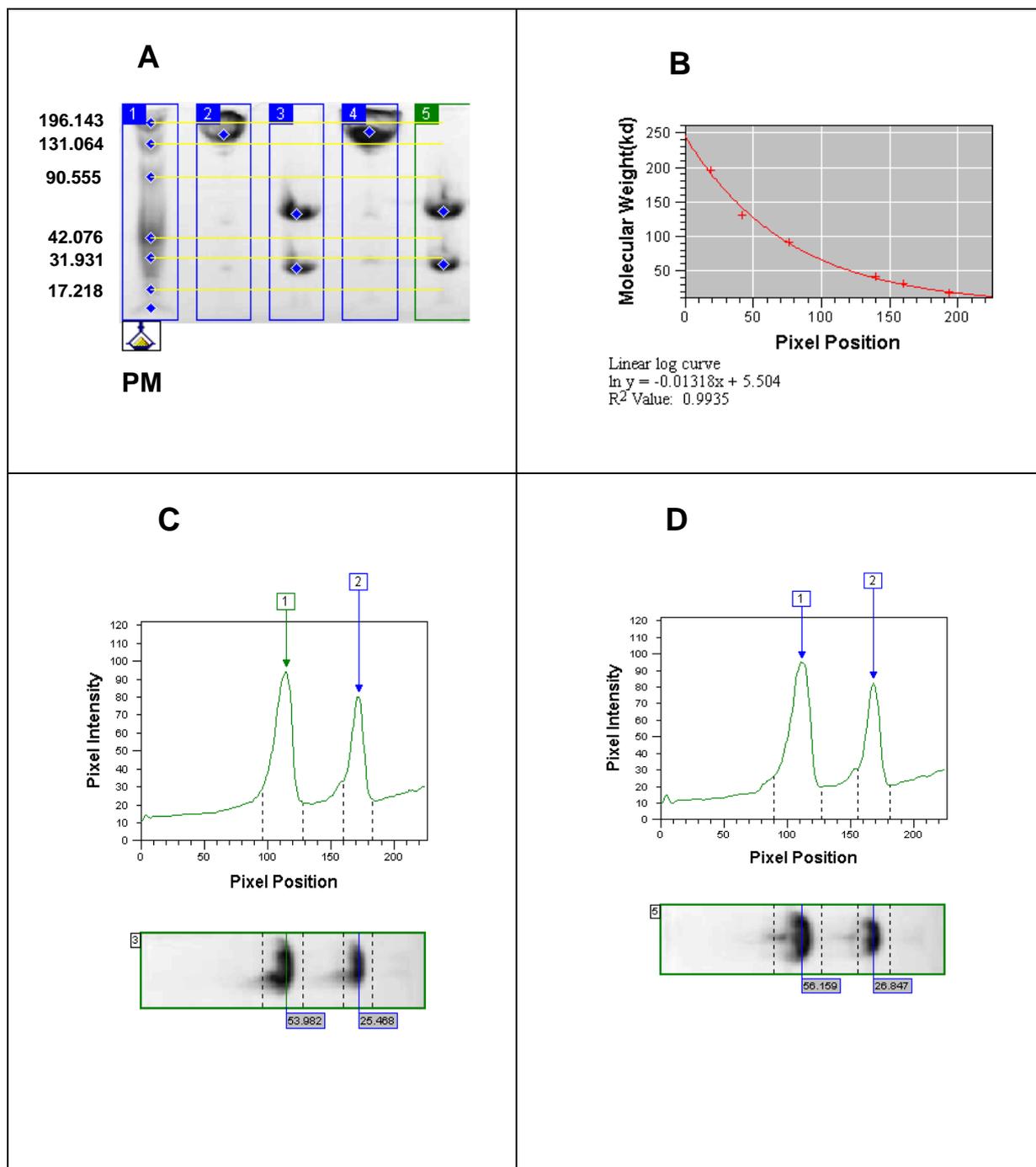


Figura 4.5: Análise do anticorpo monoclonal anti-PBP2a no programa *Image Master*. A) Eletroforese SDS-PAGE gradiente 8-25% das frações isoladas da purificação. Coluna 1: padrão de peso molecular (PM); colunas 2 e 4: amostra do Mab anti-PBP2a não tratada com DTT; colunas 3 e 5: amostra do Mab anti-PBP2a tratada com DTT. B) Curva de calibração das amostras migradas no gel de acordo com o padrão de peso molecular. C) Eletroforetograma e análise densitométrica da amostra tratada com DTT (coluna 3). D) Eletroforetograma e análise densitométrica da amostra tratada com DTT (coluna 5).

D) Análise da homogeneidade protéica

A homogeneidade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi confirmada por NATIVE-PAGE o qual apresenta somente a banda relativa à imunoglobulina (colunas 1 a 3, figura 4.6).

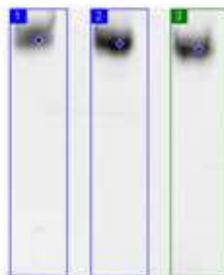


Figura 4.6: Análise da homogeneidade do Mab anti-PBP2a em gel de poliacrilamida NATIVE-PAGE gradiente de concentração 8-25% utilizando o programa *Image Master*. Colunas 1 a 3: 4 µg da imunoglobulina anti-PBP2a.

4.1.3. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a

A atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi avaliada por ELISA, como observado na curva representada na figura 4.7, o qual demonstrou ser capaz de reconhecer a PBP2a em concentrações que variaram de 100 nanogramas até 24 picogramas.

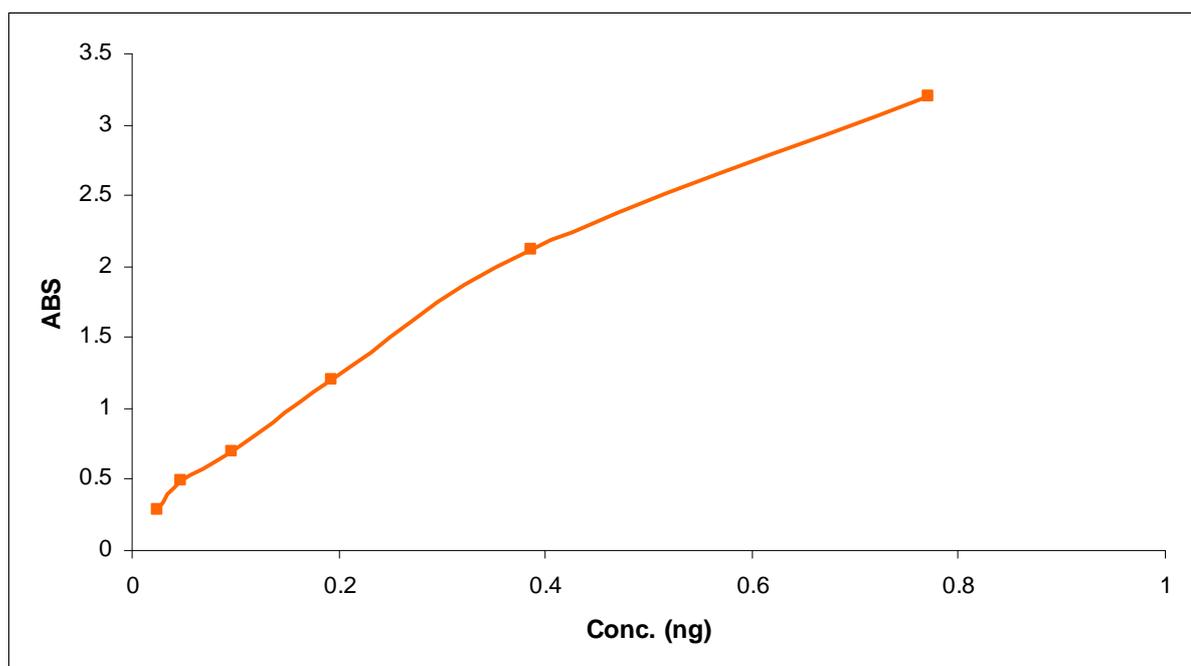


Figura 4.7: Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a por ELISA, com a adição da proteína purificada PBP2a 0,25 µg/poço e da imunoglobulina anti-PBP2a nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,55; 0,77; 0,387; 0,194; 0,097; 0,048 e 0,024 ng/poço. A densidade óptica do branco de reação foi descontada dos valores representados na curva.

4.2. Processos de conjugação

4.2.1. Quantificação das microesferas

De acordo com os dados fornecidos pela Merck, a concentração (p/v) da suspensão de microesferas utilizadas no processo de conjugação é de 9%. Este valor foi comparado aos valores estimados por quantificação, os quais se encontram representados na tabela 4.1.

A concentração média das microesferas foi de 8,2%. O erro calculado foi de 9,2% em relação ao valor indicado pelo fabricante. Desta forma, considerando a taxa de variação inferior a 10%, os valores não foram ajustados, assumindo a concentração indicada como um valor real.

Tabela 4.1: Determinação da concentração média (%) das microesferas utilizadas no processo de conjugação.

Microesfera (g)	Volume (mL)	Concentração (mg/mL)	Concentração (%)
0,0019	0,02	0,095	9,5
0,0034	0,04	0,085	8,5
0,0047	0,06	0,078	7,8
0,0061	0,08	0,076	7,6
0,0074	0,1	0,074	7,4

4.2.2. Acoplamento covalente

O método do acoplamento covalente, o qual utiliza a reatividade do grupo funcional das microesferas para acoplagem, não obteve sucesso, uma vez que na concentração de 0,2 mg/mL do Mab anti-PBP2a, formou-se um precipitado ao final do processo, inviabilizando sua utilização. Provavelmente, o precipitado se deve à interação da imunoglobulina com mais de uma microesfera, formando um grande complexo o qual tende a precipitar.

4.2.3. Adsorção passiva

O processo de conjugação entre o Mab anti-PBP2a e as microesferas foi estabelecido, neste trabalho, com base no método de adsorção passiva, um método simples e flexível, o qual foi realizado variando a concentração do anticorpo monoclonal anti-PBP2a entre 0,2 mg/mL a 1 mg/mL, possibilitando melhor visualização dos parâmetros físico-químicos do conjugado e da intensidade da banda no teste diagnóstico.

No processo de adsorção, a concentração de 2,8 mg/mL de imunoglobulina anti-PBP2a foi adicionada ao meio reacional para acoplagem, entretanto foram observados grumos e separação das fases.

4.2.4. Caracterização do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a

A estimativa do grau de marcação das microesferas pelo Mab anti-PBP2a foi realizado segundo Bangs (2008a), utilizando o espectro de varredura da IgG pura (Figura 4.9) e do sobrenadante retirado após incubação da proteína com as

microesferas no processo de acoplamento (Figura 4.10). O cálculo foi efetuado com base na fórmula:

$$C = \text{ABS}_{280 \text{ nm}} \times F_{\text{dil.}} / \epsilon$$

Logo, de acordo com os dados obtidos no espectro de varredura das amostras citadas, a concentração de imunoglobulina pura foi de 1,1 mg/mL. A concentração de imunoglobulina no sobrenadante após incubação foi de 0,5 mg/mL, entretanto, na mistura reacional foi adicionado somente 0,25 mg/mL da imunoglobulina anti-PBP2a. Portanto, este valor é discordante, uma vez que a concentração no sobrenadante foi superior à adicionada inicialmente.

Entretanto, o conjugado atendeu aos critérios estabelecidos para o funcionamento do teste diagnóstico, o qual pode ser comprovado pelo padrão de bandas abaixo (Figura 4.8), o qual foi determinado com base na intensidade das bandas. O volume de conjugado microesferas x Mab anti-PBP2a adicionado foi variado entre 5, 10 e 20 μL a fim de obter os padrões P1, P2 e P3, respectivamente.

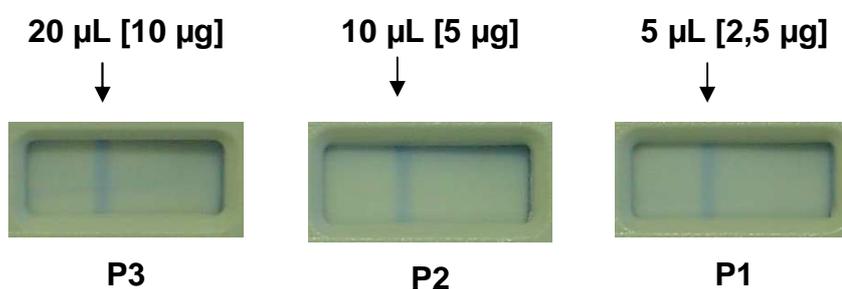


Figura 4.8: Padrão de bandas estabelecido para o conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a 0,5 mg/mL. Na 1ª janela foi adicionado 20 μL do conjugado (P3), na 2ª janela 10 μL do conjugado (P2) e na 3ª janela 5 μL do conjugado (P1). A membrana de nitrocelulose empregada no ensaio foi 150 CNPH-N-SS40 (MDI) impregnada com 10 μL da proteína purificada PBP2a 0,36 mg/mL. O tampão utilizado foi Tampão 2 + sacarose 2%.

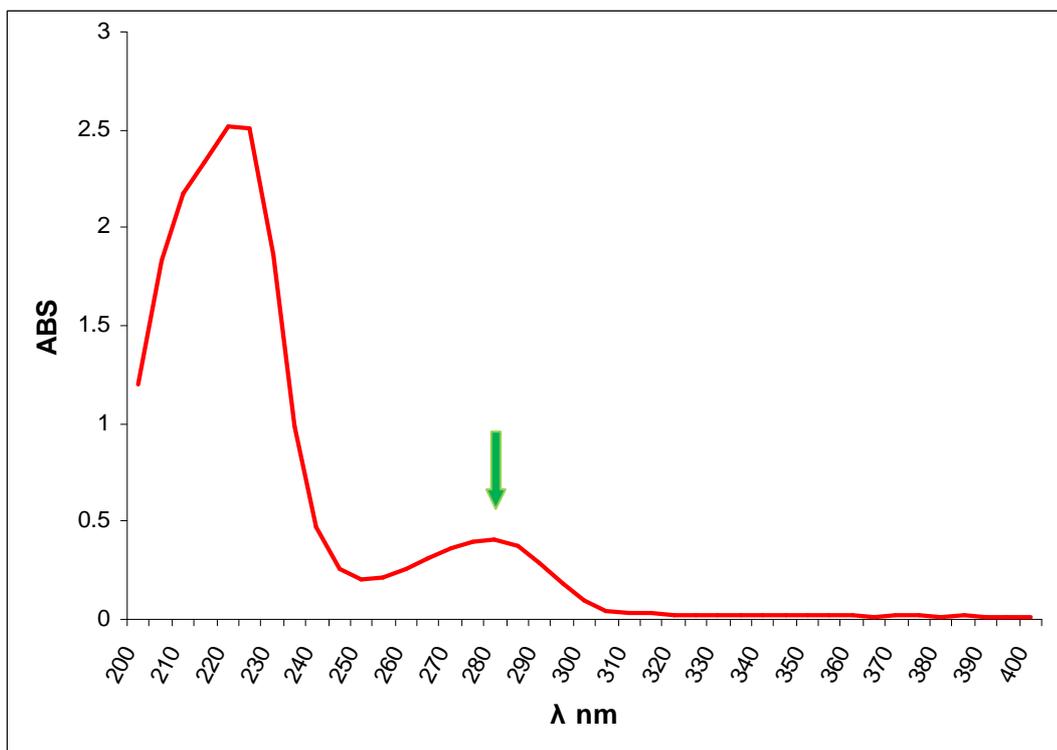


Figura 4.9: Espectro de varredura da IgG pura diluída 1:4 cuja faixa de leitura variou entre 200 a 400 nm. A concentração de imunoglobulina foi determinada com base na absorvância a 280 nm indicada pela seta.

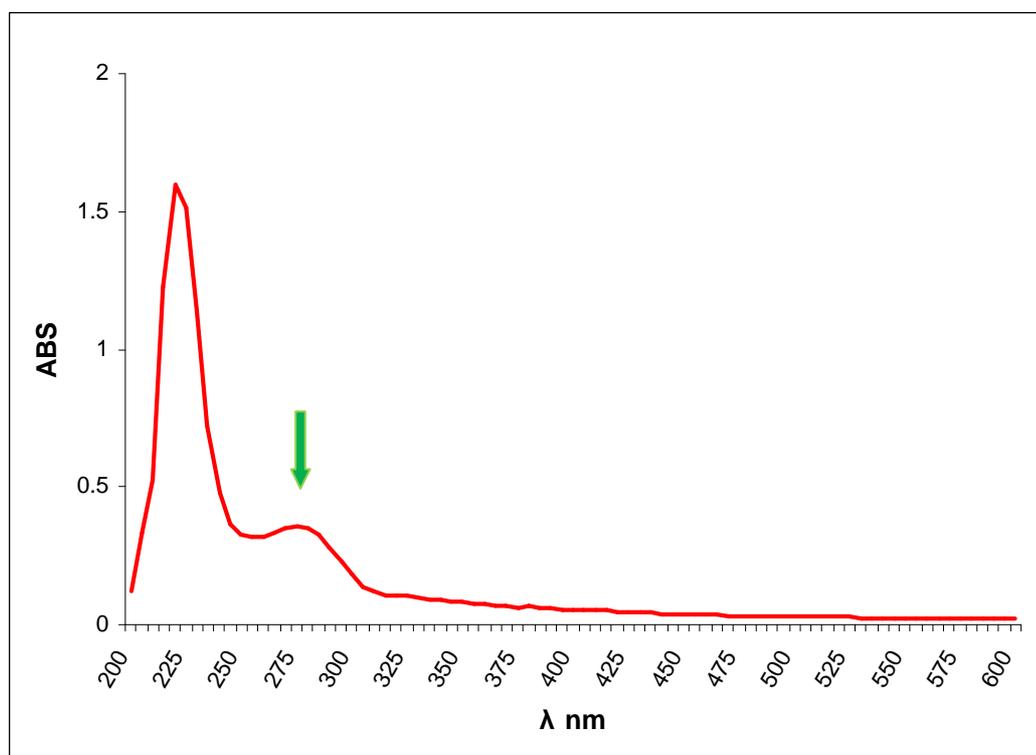


Figura 4.10: Espectro de varredura do sobrenadante de microesfera conjugada ao anticorpo monoclonal anti-PBP2a 0,25 mg/mL diluído 1:2, cuja faixa de leitura variou entre 200 a 600 nm. A concentração de imunoglobulina na amostra foi determinada com base na absorvância a 280 nm indicada pela seta.

4.2.5. Avaliação do conjugado microesfera x Mab anti-PBP2a por *Lateral Flow*

Os conjugados produzidos pelo método da adsorção passiva foram avaliados na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*. É importante mencionar que os conjugados avaliados segundo o ensaio direto e indireto foram produzidos em diferentes concentrações, a fim de estabelecer a concentração ideal de anticorpo monoclonal anti-PBP2a a ser utilizada nos processos de conjugação.

O objetivo dos ensaios realizados (direto e indireto) foi a correta identificação da linha teste (no caso de resultado reagente) determinada com base na intensidade das bandas. A variação na concentração da imunoglobulina permitiu observar que concentrações acima de 0,5 mg/mL não configuraram alteração na identificação das amostras (reagente ou não-reagente), ou seja, na visualização da linha teste. Logo, os conjugados foram padronizados na concentração de 0,5 mg/mL de anticorpo monoclonal anti-PBP2a.

Alguns dos ensaios realizados foram exemplificados abaixo (tabelas 4.2 e 4.3) juntamente com a avaliação descrita nos laudos. Entretanto, é importante mencionar que a cada novo conjugado produzido, um novo ensaio foi executado, a fim de avaliar o processo de conjugação. Comprovando o êxito, o novo conjugado era aplicado na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*, juntamente com as amostras bacterianas.

Tabela 4.2: Avaliação do conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a por *Lateral Flow* (ensaio direto) empregando os reativos abaixo.

Ensaio direto	Proteína PBP2a impregnada/fita	Tampão	Conjugado µg/fita
Teste A (TA)	0,11 µg	<i>Lateral Flow</i>	5 µg
Teste B (TB)	0,11 µg	PBS	5 µg
Teste C (TC)	0,42 µg	PBS-T	5 µg

Laudo 1: Em ambos, TA e TB, o conjugado migrou corretamente na presença do tampão *Lateral Flow* e PBS, respectivamente, apresentando uma banda P2 na linha teste. No ensaio TC, o conjugado migrou corretamente, apresentando banda P3 na linha teste e *background* regular.

Tabela 4.3: Avaliação do conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a por *Lateral Flow* (ensaio indireto) empregando os reativos abaixo.

Ensaio indireto	Mab anti-PBP2a impregnado/fita	Tampão	Conjugado µg/fita
Teste D (TD)	0,43 µg	PBS-T	5 µg
Teste E (TE)	0,43 µg	PBS-T	10 µg
Teste F (TF)	0,92 µg	PBS-T	2,5 µg

Laudos 2: Em ambos, TD e TE, o conjugado migrou corretamente na presença do tampão PBS-T, apresentando banda P3 na linha teste. O ensaio TD apresentou *background* regular. No modelo TF, o conjugado migrou corretamente, com banda P2 na linha teste.

Em ambos os laudos, o conjugado demonstrou bom desempenho, cumprindo as exigências para ser aplicado com as amostras bacterianas.

4.3. Avaliação imunológica de células MRSA, MSSA e SCN

4.3.1. Avaliação da atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a contra células íntegras MRSA e SCN por ELISA

A atividade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi avaliada por ELISA empregando amostras bacterianas de células MRSA COL (*mecA* +), MRSA COL (*mecA* -) e SCN (*mecA* -) como antígeno. A seleção das amostras bacterianas foi baseada na expressão de duas proteínas de superfície: a proteína PBP2a (alvo específico para a detecção de MRSA) e a proteína A.

A primeira é codificada pelo gene *mecA* e encontra-se presente em amostras MRSA COL (*mecA* +). A segunda é encontrada na espécie *Staphylococcus aureus* (Sjödahl 1977). A cepa MRSA COL (*mecA* -) é nocaute para o gene *mecA*, portanto, não expressa a proteína PBP2a, já a amostra SCN sensível não apresenta as duas proteínas de interesse, proteína A e PBP2a, funcionando como o controle negativo do teste.

Os resultados do ensaio mostraram afinidade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a por amostras MRSA COL (*mecA* +) e MRSA COL (*mecA* -), como observado na figura 4.11. A amostra SCN sensível apresentou baixa afinidade pela

imunoglobulina. A amostra MRSA COL (*mecA* +) apresentou forte interação com a imunoglobulina e a cepa MRSA COL (*mecA* -) apresentou menor interação.

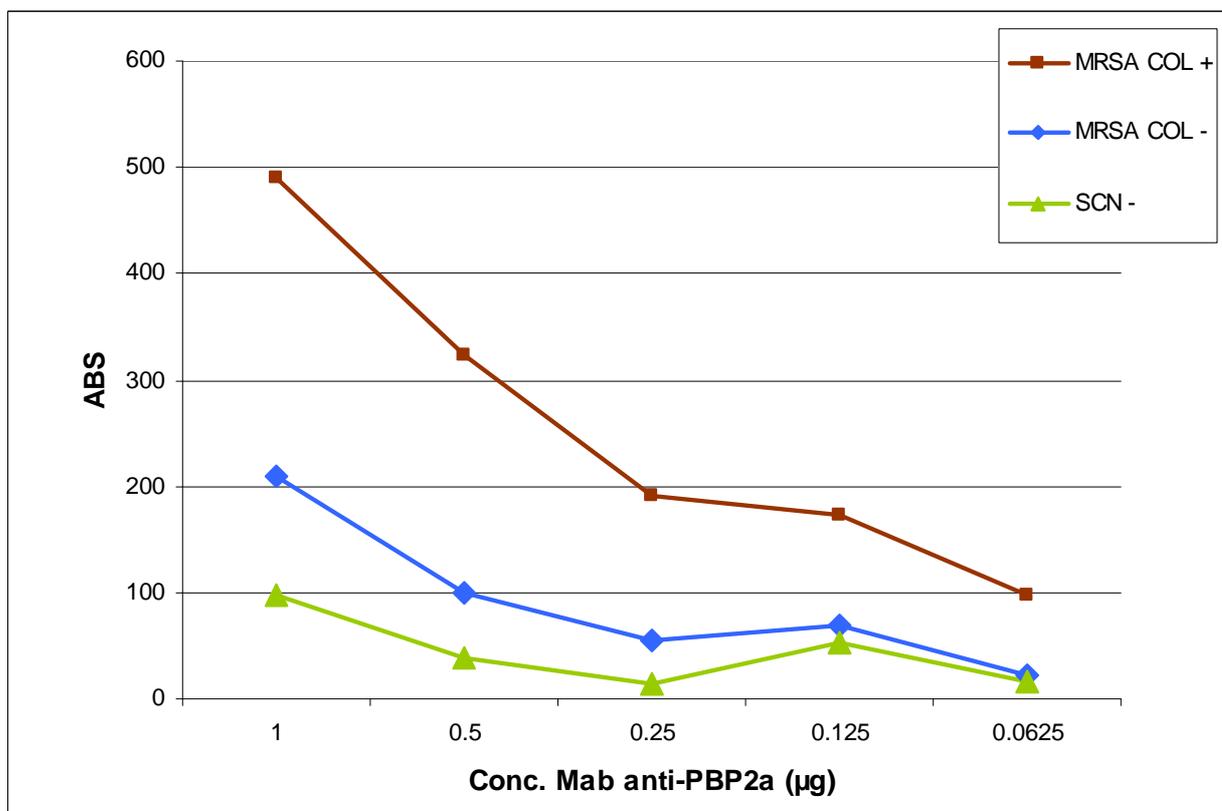


Figura 4.11: Avaliação do reconhecimento da proteína recombinante PBP2a em amostras íntegras MRSA COL (*mecA* +), MRSA COL (*mecA* -) e SCN (*mecA* -) pelo anticorpo monoclonal anti-PBP2a por ELISA. A linha em vermelho indica a cepa MRSA COL (+), a linha em azul indica a cepa MRSA COL (-) e a linha em verde indica a cepa SCN (-).

4.3.2. Avaliação da atividade *in vitro* do anticorpo monoclonal anti-PBP2a contra células íntegras MRSA e MSSA por microscopia ótica

Com o objetivo de avaliar a interação estabelecida entre a imunoglobulina e o patógeno, as amostras MRSA COL (*mecA* +) e MSSA ATCC 25923 incubadas com o anticorpo monoclonal anti-PBP2a foram submetidas à coloração pelo método de Gram, e visualizadas por microscopia ótica (100x).

A Figura 4.12a permite identificar uma coloração irregular (mais clara) e morfologia celular alterada da cepa MRSA COL (*mecA* +), com aspecto semelhante aos diplococos. Provavelmente, isto se deve ao bloqueio da divisão celular causado pela imunoglobulina ligada à PBP2a, a qual é responsável pela biossíntese da parede celular de MRSA durante a multiplicação celular.

Já a Figura 4.12b ilustra a coloração tipicamente Gram-positiva, sem alteração da morfologia celular das cepas MSSA ATCC 25923. Logo, pode-se supor que a interação estabelecida entre o anticorpo monoclonal anti-PBP2a e as células MSSA não representou efeito sobre as mesmas.

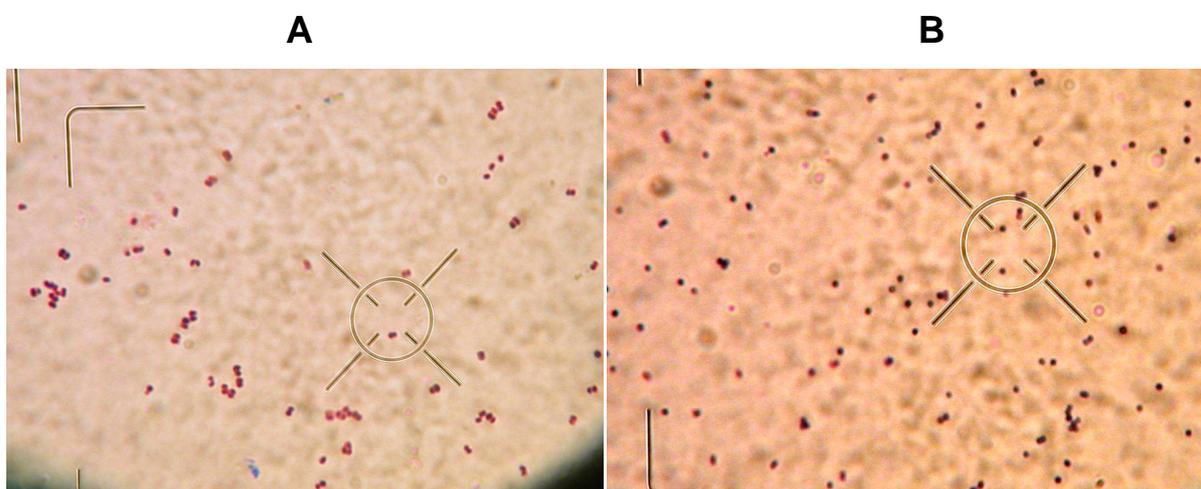


Figura 4.12: Amostras de colônias íntegras MRSA e MSSA coradas pelo método de Gram e analisadas por microscopia ótica em imersão (100x). A) Amostra MRSA COL (*mecA* +) incubada com 4 µg de Mab anti-PBP2a por 4h a 37°C. B) Amostra MSSA ATCC 25923 incubada com 4 µg de Mab anti-PBP2a por 4h a 37°C.

4.4. Avaliação do ensaio de *Lateral Flow* com células íntegras e lisadas MRSA, MSSA e SCN

Durante o desenvolvimento do trabalho experimental, inúmeras condições reacionais foram avaliadas e modificadas como, por exemplo, os tampões de corrida, as membranas que compõem a plataforma imunocromatográfica e as concentrações dos reativos, com o objetivo de aperfeiçoar o ensaio de *Lateral Flow* utilizando amostras bacterianas e obter resultados satisfatórios. Entretanto, apenas foram mencionadas as principais reações, representadas nas tabelas 4.4, 4.5 e 4.6.

A) Colônias íntegras MRSA e MSSA

Tabela 4.4: Avaliação das amostras bacterianas íntegras MRSA e MSSA na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* utilizando o conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a empregando diferentes concentrações dos reativos abaixo (MN = membrana de nitrocelulose).

Ensaio indireto	Membrana de nitrocelulose	Mab anti-PBP2a impregnado/fita	Volume de amostra	Conjugado µg/fita
T1 SPI	MN W	0,43 µg	100 µL	5 µg
T2 SPI	MN W	0,85 µg	100 µL	5 µg
T3 GPI	MN W	0,92 µg	100 µL	2,5 µg
T4 8975I	MN Viv	0,92 µg	10 µL	2,5 µg
T5 8975I	MN Viv	0,92 µg	10 µL	5 µg

Laudos T1 SPI: A banda referente à linha teste não foi visualizada na presença das amostras MRSA COL (*mecA* +) e MSSA ATCC 25923, utilizando o tampão PBS-T.

Laudos T2 SPI: A banda referente à linha teste não foi visualizada na presença das amostras MRSA COL (*mecA* +) e MSSA ATCC 25923, utilizando o tampão PBS-T.

Laudos T3 GPI: A banda referente à linha teste não foi visualizada na presença da amostra MRSA COL (*mecA* +) utilizando o tampão PBS-T. A amostra MSSA ATCC 25923 não foi avaliada.

Laudos T4 8975I: A banda referente à linha teste foi visualizada (banda muito fraca) na presença das amostras MRSA COL (*mecA* +) e MSSA ATCC 25923, utilizando o tampão 2 .

Laudos T5 8975I: A banda referente à linha teste foi visualizada (banda muito fraca) na presença das amostras MRSA COL (*mecA* +) e MSSA ATCC 25923, utilizando o tampão 2. Utilizando o tampão *Lateral Flow* a banda não foi visualizada.

B) Colônias lisadas MRSA e MSSA

Tendo em vista a dificuldade apresentada pelas bactérias íntegras em migrar pelos poros da membrana de nitrocelulose que compõem a plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*, foi realizado um processo de lise celular,

conforme previamente descrito, a fim de melhorar a mobilidade das proteínas bacterianas. Na tabela 4.5 estão descritas as condições avaliadas.

Tabela 4.5: Avaliação das amostras bacterianas lisadas MRSA e MSSA na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* utilizando o conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a empregando diferentes concentrações dos reativos abaixo (MN = membrana de nitrocelulose).

Ensaio indireto	Membrana de nitrocelulose	Mab anti-PBP2a impregnado/fita	Volume de amostra	Conjugado µg/fita
T1 SPL	MN W	0,43 µg	100 µL	5 µg
T2 SPL	MN W	0,43 µg	100 µL	10 µg
T3 SPL	MN W	0,92 µg	100 µL	2,5 µg
T4 8975L	MN Viv	0,92 µg	10 µL	5 µg

Laudo T1 SPL: A banda referente à linha teste não foi visualizada na presença da amostra MRSA COL (*mecA* +) utilizando o tampão PBS-T. A amostra MSSA ATCC 25923 não foi avaliada.

Laudo T2 SPL: A banda referente à linha teste não foi visualizada na presença da amostra MRSA COL (*mecA* +) utilizando o tampão PBS-T. A amostra MSSA ATCC 25923 não foi avaliada.

Laudo T3 SPL: A banda referente à linha teste não foi visualizada na presença da amostra MRSA COL (*mecA* +) com o tampão DPP Leptospirose, entretanto, uma banda P1 foi observada na presença do tampão PBS-T. A amostra MSSA ATCC 25923 não foi avaliada.

Laudo T4 8975L: A banda P1 foi observada na presença das amostras MRSA COL (*mecA* +) e MSSA ATCC 25923 utilizando o tampão 2.

C) Colônias lisadas MRSA e SCN

A fim de avaliar a ligação inespecífica estabelecida entre o anticorpo monoclonal anti-PBP2a e amostras bacterianas MRSA COL (*mecA* +) e MSSA ATCC 25923, foi realizado o ensaio com amostras lisadas MRSA COL (*mecA* +), as quais apresentam proteína A, e amostras lisadas SCN (*mecA* -), as quais não

apresentam proteína A, nas condições representadas na tabela 4.6 e visualizadas na figura 4.13a e 4.13b.

Tabela 4.6: Avaliação das amostras bacterianas lisadas MRSA e SCN na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* utilizando o conjugado microesferas coradas x IgG cão (SIGMA) empregando diferentes concentrações dos reativos abaixo (MN = membrana de nitrocelulose).

Ensaio indireto	Membrana de nitrocelulose	IgG de cão impregnada/fita	Volume de amostra	Conjugado µg/fita
T5 8975L	MN 150	0,61 µg	5 µL	2 µg

Laudo T5 8975L: A banda P1 foi visualizada na presença da amostra MRSA COL (*mecA* +) como demonstrado abaixo e não foi visualizada na presença da amostra SCN (*mecA* -), ambas utilizando o tampão 2 + sacarose 2%.

A) Amostras MRSA COL (*mecA* +)



B) Amostras SCN (*mecA* -)



Figura 4.13: Ensaio de *Lateral Flow* com amostras lisadas MRSA e SCN empregando a MN 150 CNPH-N-SS40 impregnada com 10 µL de IgG cão 2,0 mg/mL e MC 8975. A) Foi adicionado 5 µL do lisado bacteriano MRSA COL (*mecA* +) juntamente com 4 µL do conjugado microesferas x Mab anti-PBP2a 0,5 mg/mL e 3 gotas de tampão 2 + sacarose 2%. B) Foi adicionado 5 µL do lisado bacteriano SCN (*mecA* -) juntamente com 4 µL do conjugado microesferas x Mab anti-PBP2a 0,5 mg/mL e 3 gotas de tampão 2 + sacarose 2%.

Estes resultados indicam que a ligação estabelecida entre uma imunoglobulina sem afinidade específica pela PBP2a pode estar sendo causada pela presença da proteína A, presente na cepa MRSA avaliada e ausente na cepa SCN.

5. DISCUSSÃO

O crescente aumento, nos últimos anos, do uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro tem levado à proliferação de cepas bacterianas resistentes. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) é uma variante resistente a antibióticos, encontrado nos hospitais do mundo inteiro, sendo considerado o maior causador das infecções nosocomiais (Fong *et al.* 2000). A prevalência deste patógeno tem aumentado dramaticamente, por isso, existe a necessidade de implementar métodos rápidos e eficazes para sua identificação. A detecção precoce (24 horas) pode modificar a conduta clínica e, muitas vezes, salvar a vida de um paciente.

Os métodos convencionais empregados na detecção de MRSA envolvem testes de suscetibilidade que dependem da expressão fenotípica de resistência, os quais requerem tempo e intenso trabalho (Fong *et al.* 2000). Já os métodos moleculares possuem alto custo e dificuldade de implantação nos pequenos centros de saúde.

Atualmente, existem kits de aglutinação em partículas de látex para a detecção de resistência à meticilina usando o anticorpo específico para o antígeno PBP2a, comercializado pelas empresas *Oxoid* e *Biomérieux*, porém, o processo industrial para o desenvolvimento deste teste é mantido sob sigilo (www.oxoid.com). Tal kit é de alto custo o que impede sua ampla utilização no sistema público de saúde.

Assim, como Bio-Manguinhos (FIOCRUZ) dispõe de uma plataforma para testes *Lateral Flow*, o anticorpo monoclonal anti-PBP2a desenvolvido nesta unidade, foi avaliado quanto à possível aplicação na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*, cuja metodologia é caracterizada pela simplicidade de execução e rapidez no diagnóstico de doenças infecciosas. Além disto, o teste rápido *Lateral Flow* possui baixo custo, facilitando sua implantação em laboratórios de microbiologia clínica em diversas regiões do país.

Este ensaio é baseado na detecção da proteína de ligação à penicilina denominada PBP2a, a qual confere resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos e cuja função celular é catalisar as reações de transpeptidação na biossíntese da

parede celular (Lowy 2003). A reação na plataforma de teste é caracterizada pela ligação específica antígeno-anticorpo e revelada pelo conjugado Mab anti-PBP2a x microesferas coradas.

5.1. Caracterização do anticorpo monoclonal anti-PBP2a

O sobrenadante de cultura de células de fusão 90/DA5/CB5/AA3 fornecido pelo LATAM (meio sem soro, 1% BSA - lote 04/2009) foi purificado através de cromatografia por afinidade e as frações cromatográficas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%, confirmando a presença da imunoglobulina anti-PBP2a devido às bandas localizadas na região de, aproximadamente, 25 kDa e 50 kDa.

O peso molecular das cadeias leve e pesada foi estimado em 26 kDa e 54 kDa, respectivamente, e o peso molecular nativo da imunoglobulina anti-PBP2a determinado foi de 162 kDa, correspondendo ao esperado para imunoglobulinas. Segundo análise do IEF-PAGE, o anticorpo monoclonal anti-PBP2a apresentou 3 isoformas com ponto isoelétrico variando entre 6,85 a 7,35. A homogeneidade foi confirmada pela presença de uma banda somente, relativa à imunoglobulina anti-PBP2a. A funcionalidade da imunoglobulina foi avaliada por ELISA, o qual demonstrou a capacidade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a em reconhecer o antígeno alvo.

5.2. Processos de conjugação

Inicialmente, as microesferas Estapor[®] coradas internamente foram quantificadas segundo seu peso seco, estimado após tentativa de contagem utilizando a técnica tradicionalmente empregada em microbiologia para contagem de células em hematocítmetro (câmara de *Neubauer*). Entretanto, devido aos agregados formados pelas partículas em suspensão, o método não possibilitou a contagem das partículas coloridas.

Neste caso, para contagem das microesferas seria necessário um contador específico o qual não se encontra disponível em nossas instalações, uma vez que o diâmetro das partículas é de apenas 0,3 μm . Portanto, a quantificação foi estabelecida de acordo com o peso seco das microesferas e o valor comparado ao valor informado pela Merck.

Segundo a quantificação, a concentração de microesferas em suspensão foi considerada de acordo com os dados fornecidos pelo fabricante, dado que o erro determinado foi inferior a 10%. Logo, nenhum ajuste foi realizado no intuito de corrigir esta relação, e a concentração informada foi considerada como a concentração real das microesferas empregadas nos processos de conjugação. Desta forma, é importante ressaltar que tais medidas, as quais empregaram pequenos volumes da suspensão de microesferas, tendem a um erro maior se comparado ao manuseio de grandes volumes. Portanto, acredita-se que o valor estimado seria similar ao valor informado pela Merck no caso de implantação, em linha de produção, de um kit diagnóstico.

O processo de conjugação estabelecido para acoplagem do anticorpo monoclonal anti-PBP2a às microesferas coloridas foi baseado no método da adsorção passiva. Isto se deve ao mau funcionamento do conjugado produzido segundo a metodologia do acoplamento covalente, o qual apresentou agregados ao final do processo e, quando desafiado na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*, não revelou a linha reagente (positiva) do teste.

A questão a ser considerada são os reagentes empregados neste processo de conjugação como, por exemplo, o Sulfo-NHS, o qual reage formando uma ponte entre o grupo reativo da microesfera e a imunoglobulina a ser acoplada. Tais reagentes são chamados reagentes de conjugação homobifuncionais, uma vez que sua estrutura química é constituída de uma cadeia carbônica separando dois terminais contendo grupamentos reativos idênticos. Em função desta característica, tais reagentes introduzem um espaçador entre as moléculas a serem conjugadas, podendo influenciar e favorecer a precipitação. É importante mencionar que a principal desvantagem no uso desta classe de reagentes de conjugação está na obtenção de agregados devido à formação de ligações intra-cadeias (Hermanson 1996c). Desta forma, a relação microesfera/IgG poderia ser alterada em função da reatividade dos grupamentos, a fim de obter um conjugado padronizado para este ensaio.

No processo de conjugação pelo método da adsorção passiva, a concentração de imunoglobulina foi variada na tentativa de estabelecer a concentração ideal que conduzisse a boa visualização da linha teste. Segundo o fabricante (Bangs Laboratories 2008a), a concentração de ligantes deveria ser adicionada em excesso na reação, com o objetivo de garantir a correta orientação da imunoglobulina (ligante), entretanto, a reatividade do conjugado foi considerada

satisfatória até a concentração de 1 mg/mL de proteína, e a partir de 2,8 mg/mL, o conjugado precipitou a ponto de ocorrer separação das fases (microesfera/tampão de acoplagem).

Outro fato importante a ser considerado no processo de conjugação é a agregação das microesferas, dificultando sua migração pelos poros das membranas que compõem a plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* (Bangs Laboratories 2008c). Segundo Bangs (2008a), o ponto isoelétrico da imunoglobulina exerce influência no processo de agregação das microesferas e o tampão de acoplagem utilizado na conjugação deve possuir pH próximo ao pI da referida imunoglobulina. Por isso, o tampão escolhido para acoplagem foi PBS 7,2, cujo resultado mostrou-se satisfatório.

A desvantagem deste método de conjugação é a baixa estabilidade do conjugado, uma vez que não foi estabelecida ligação entre as biomoléculas, favorecendo à dissociação da imunoglobulina da superfície da microesfera em curto período de tempo (Bangs 2008a).

Entretanto, de acordo com os ensaios realizados na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* empregando a proteína recombinante purificada como antígeno, as reações do conjugado com a proteína imobilizada se mostraram satisfatórias, permitindo concluir que o processo de conjugação alcançou o objetivo proposto. Entretanto, a quantificação da imunoglobulina acoplada à superfície da microesfera segundo o método sugerido pelo fabricante (Bangs Laboratories 2008a), apresentou um resultado discordante e não pôde ser estimada. Isto provavelmente é devido à baixa estabilidade das microesferas que, como observado durante o processo de conjugação, perde corante ao longo do tempo, e este pode influenciar na absorvância a 280 nm, permitindo obter uma concentração superior ao valor adicionado no meio reacional, como foi observado.

Os métodos de quantificação colorimétricos não foram utilizados devido à cor apresentada pelo sobrenadante de microesfera conjugada (0,25 mg/mL), a qual poderia interferir na quantificação assim como influenciou no método avaliado. Uma alternativa seria a purificação do sobrenadante para seleção apenas das imunoglobulinas presentes em solução e assim, proceder à quantificação por ambos os métodos, ou efetuar um processo de diálise, separando a imunoglobulina de interesse dos resíduos presentes em solução. Entretanto, como o conjugado apresentou resultados satisfatórios na presença da proteína purificada, mostrando

um padrão de bandas com reprodutibilidade, prosseguimos à avaliação das amostras bacterianas.

É importante mencionar a escolha do processo de conjugação via microesferas coloridas em detrimento do método via ouro coloidal. Apesar desta plataforma ser empregada em kits diagnóstico produzidos em Bio-Manguinhos, existem alguns fatores limitantes como, por exemplo, seria necessária a adaptação dos protocolos de produção a pequenas escalas, além das inúmeras etapas a serem cumpridas na execução do processo, o que gera dificuldade, uma vez que seria necessário produzir conjugados em diversas concentrações a fim de avaliação na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*. Outra questão a ser abordada é o tempo total para realização do processo de conjugação via ouro coloidal, o qual é realizado em aproximadamente 2 dias, comparado ao processo de conjugação utilizando as microesferas coradas que é realizado em aproximadamente 5 horas.

Entretanto, o processo de conjugação utilizando as partículas de ouro coloidal não foi descartado durante o estudo. Caso fosse necessária sua aplicação, o conjugado seria empregado para teste com as amostras bacterianas.

5.3. Amostras empregadas na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*

A proteína A presente em cepas estafilocócicas desempenha um importante papel nas reações em imunodiagnóstico, devido à sua interação específica com a porção F_c de imunoglobulinas (Moks *et al.* 1986), sendo também largamente empregada em imunocromatografia de afinidade para purificação de anticorpos.

Estudos mostraram que a proteína A possui uma estrutura pentamérica, formada por cinco domínios (A, B, C, D e E), os quais se ligam à porção F_c das imunoglobulinas com diferentes afinidades, seguido por um domínio C-terminal, responsável por ancorar a proteína na parede celular do *Staphylococcus aureus* (Sjödahl 1977).

Estas características corroboram a hipótese de reação cruzada estabelecida entre o anticorpo monoclonal anti-PBP2a e a proteína A presente na superfície de cepas de *S. aureus*. De acordo com o ensaio de ELISA, empregando cepas estafilocócicas como antígeno, foi observada uma reação contra as cepas de *S. aureus* sensível à metilicina (MSSA), provavelmente devido à ligação inespecífica com a proteína A presente nestas cepas.

Como esperado, a cepa *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo não demonstrou interação com o anticorpo monoclonal anti-PBP2a, provavelmente devido a ausência de proteína A e PBP2a na superfície (Sjödahl 1977). Estes resultados iniciais foram posteriormente investigados quanto à interação estabelecida entre o anticorpo monoclonal anti-PBP2a e as cepas bacterianas MRSA e MSSA, através da visualização por microscopia, após incubação das amostras com o referido anticorpo.

No entanto, foram observadas diferenças entre as cepas MRSA e MSSA, principalmente em sua morfologia, sugerindo a interação entre a célula MRSA e o anticorpo monoclonal anti-PBP2a, o qual provavelmente estabelece inibição da divisão celular e, desta forma, as colônias permanecem descoloradas, de tamanho menor e morfologia semelhante a diplococos, levando a pensar em uma divisão celular incompleta. Esta observação tem origem no conhecimento de que amostras MRSA super-expressam a proteína PBP2a no momento da divisão celular, na presença de taxas elevadas do precursor de peptidoglicano, para biossíntese da parede celular (Berger-Bächli & Rohrer 2002).

Além disso, observamos um menor número de células nas amostras MRSA comparado ao MSSA, provavelmente devido à degradação causada pela ação da imunoglobulina anti-PBP2a.

Já as células MSSA não apresentaram alteração morfológica em consequência da interação com o anticorpo monoclonal anti-PBP2a, sugerindo que este não apresenta ação contra os processos metabólicos da célula. Provavelmente, a ligação é somente entre a proteína A presente na superfície do *Staphylococcus aureus* e o anticorpo monoclonal.

Estes dados foram semelhantes àqueles observados na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*, cujas amostras MRSA e MSSA, quando submetidas ao ensaio, apresentaram resultado positivo (reagente). Ou seja, as amostras interagiram com o anticorpo monoclonal anti-PBP2a impregnado na membrana de nitrocelulose, e a amostra MSSA foi classificada como um resultado falso-positivo, onde provavelmente a ligação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a ocorreu devido a proteína A.

Assim, com o objetivo de avaliar esta possível interação, duas amostras diferentes foram selecionadas para teste na plataforma de *Lateral Flow*. A amostra MRSA que possui proteína A e PBP2a na superfície e a amostra SCN que não possui as proteínas de interesse. Vale ressaltar que neste ensaio, a membrana de

nitrocelulose foi impregnada com a imunoglobulina de cão (SIGMA) e o conjugado foi produzido com 0,5 mg/mL de IgG de cão x microesferas coradas para identificação das amostras.

Outra vez, os resultados do ensaio demonstraram que provavelmente, há influência da proteína A nos resultados falso-positivos do teste. Como observado, as amostras MRSA quando adicionadas nas fitas (tiras) revelaram o resultado do teste como positivo. Já as amostras de SCN não foram reagentes, e a banda não foi visualizada. Algumas tentativas de executar este ensaio utilizando o anticorpo monoclonal anti-PBP2a ao invés da imunoglobulina de cão foram inúteis, uma vez que, devido a problemas técnicos no fornecimento do material, não tínhamos o anticorpo monoclonal necessário para a realização dos testes confirmatórios.

Algumas alternativas foram propostas para contornar este problema, como: a) clivagem do anticorpo monoclonal anti-PBP2a e purificação das frações F_{ab} para aplicação destas frações na plataforma imunocromatográfica; b) adição de soro animal ao tampão de corrida e incubação prévia com a bactéria. O soro contém imunoglobulinas totais que em contato com a amostra bacteriana, poderia saturar os sítios de ligação expostos da proteína A, presente na superfície do patógeno; c) ensaio com o anticorpo monoclonal anti-PBP2a impregnado na membrana de nitrocelulose previamente sensibilizada com proteína A purificada, a fim de que todos os anticorpos impregnados sejam alinhados na membrana em sua orientação biológica ativa, com a fração F_{ab} orientada para cima. Estas propostas deverão ser testadas de forma a contornar este problema técnico.

5.4. Padronização da plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* utilizando amostras MRSA e MSSA - Prova de princípio

Inicialmente, foram empregadas amostras de células MRSA e MSSA íntegras e/ou lisadas na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*. A Lisostafina foi utilizada no processo de rompimento das células bacterianas cujo mecanismo de ação é a clivagem da cadeia pentaglicina, responsável pela síntese da parede celular, levando à desestabilização da célula, perda do equilíbrio osmótico e conseqüente lise das cepas Staphylococci (Kokai-Kun *et al.* 2007). A solução contendo as amostras lisadas apresentou-se viscosa devido ao DNA disperso, por isso, foi adicionada a Benzonase[®] Nuclease, cuja função é degradar o material genético presente no meio (Novagen 1999).

Nos testes T1 SPI, T2 SPI, T1 SPL, T2 SPL e T3 SPL foi utilizada a membrana de nitrocelulose (MNW) juntamente com as membranas do conjugado (MC 6613), membrana da amostra (MA) e membrana absorvente (MA). Todavia, tanto as amostras íntegras (SPI), quanto às amostras lisadas (SPL) não migraram pelos poros das membranas. Provavelmente, a membrana da amostra reteve parte da suspensão de bactérias, funcionando como um filtro, mesmo com a adição da amostra em excesso (100 μ L).

A plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* padronizada para o diagnóstico do HIV 1/2, comercializado por Bio-Manguinhos, emprega a membrana da amostra constituída por papel de filtro (tratado), devido à capacidade deste em absorver componentes presentes na amostra de sangue, como as hemácias, permitindo o fluxo contínuo das proteínas de interesse (p. ex. imunoglobulinas) para correta identificação.

Desta forma, a membrana da amostra foi substituída pela MC 6613, constituída por uma trama que permite o fluxo do líquido (amostra) com maior rapidez. Entretanto, o ensaio T3 GPI não foi satisfatório, sugerindo que a MNW impediu o correto escoamento da amostra. Como esta membrana apresenta poros de 3 μ m, provavelmente as bactérias com diâmetro de 0,5 a 1 μ m ficaram retidas durante o fluxo e não alcançaram a linha teste da fita.

É importante mencionar que os primeiros ensaios empregaram a membrana de nitrocelulose Whatman[®] (3 μ m). Logo, como o tamanho do poro é pequeno, principalmente quando comparado ao diâmetro do *Staphylococcus aureus*, provavelmente este não migrou em seu estado íntegro, mesmo empregando diferentes membranas no local de aplicação da amostra. As amostras lisadas, quando submetidas ao teste com a membrana de nitrocelulose Whatman[®] e a membrana da amostra, migraram pela plataforma de teste, todavia, grande quantidade desta ficou retida e o líquido demorou a escoar.

Novamente, a membrana do conjugado foi substituída pela MC 8975 com o objetivo de facilitar o fluxo da amostra na plataforma imunocromatográfica, juntamente com a membrana de nitrocelulose, substituída pela MN Viv, a qual apresenta taxa de fluxo de 150-225 s / 4 cm. Com isso, a quantidade de amostra (suspensão de bactérias) aplicada na plataforma foi diminuída de acordo com os estudos desenvolvidos por Fong *et al.* (2000) na detecção de MRSA por imunoenensaio (*dipstick*).

O resultado dos ensaios T4 8975I, T5 8975I e T4 8975L foi obtido com visualização da banda (P1) na linha de teste, entretanto, ambas as amostras MRSA e MSSA foram reativas, confirmando os dados obtidos pelo ensaio de ELISA, o qual sugere afinidade do anticorpo monoclonal anti-PBP2a pela proteína A presente na superfície do *Staphylococcus aureus*. Tais resultados foram coerentes com os resultados demonstrados por ELISA, por isso, a metodologia de *Lateral Flow* foi empregada na identificação da proteína A, utilizando amostras MRSA e SCN no diagnóstico.

O resultado do teste T5 8975L foi satisfatório e as amostras SCN que não apresentam a proteína A, não se mostraram reativas na plataforma imunocromatográfica. Novamente, a membrana de nitrocelulose foi substituída pela MN150 e empregada nos ensaios com a proteína A. A MN 150 possui alta capacidade de fixação da proteína a ser imobilizada, com o tamanho do poro (110 µm) que permite um fluxo rápido dos reagentes pela plataforma, na ordem de 150 s / 4 cm (MDI 2011).

A partir dos resultados falso-positivos observados segundo a metodologia do *Lateral Flow*, inúmeros agentes bloqueadores foram empregados como, por exemplo, o BSA e o Tween 20 para tratamento da membrana de nitrocelulose segundo Walther & Fribe (2008c), com o objetivo de inibir as ligações inespecíficas entre o analito ou os reagentes de detecção à proteína imobilizada. O tratamento foi também aplicado aos tampões de corrida, mas os resultados foram insatisfatórios em ambos.

Vale ressaltar a importância exercida pelos tampões no fluxo das amostras pela plataforma imunocromatográfica. Como mencionado, inúmeras condições reacionais foram alteradas, inclusive a composição dos tampões, a fim de contornar as reações inespecíficas e a taxa de fluxo da amostra. O Tampão DPP Leptospirose e *Lateral Flow* foram empregados nos testes com as amostras íntegras e lisadas, entretanto, estes não possibilitaram a lise da parede bacteriana, provavelmente devido à inibição da enzima Lisostafina. A fórmula dos tampões não pode ser divulgada devido aos processos de transferência de tecnologia em Bio-Manguinhos, assim, algum componente pode ter inativado o sítio ativo da enzima e as amostras tratadas não foram lisadas.

O Tampão 1 apresentou, nos ensaios prévios realizados com a proteína purificada PBP2a, resultado falso-positivo, enquanto os Tampões 2 e 3 mostraram resultados satisfatórios quando analisados na plataforma de teste. Entretanto, o

padrão de bandas com nítida visualização da linha teste foi obtido quando o Tampão 2 sacarose 2% foi avaliado.

Cabe ressaltar que neste trabalho, os esforços foram concentrados na prova de princípio do ensaio *Lateral Flow* empregando amostras de bactérias e inúmeras condições reacionais. Devido a problemas ocorridos no fornecimento dos anticorpos monoclonais, o ensaio com a proteína A não foi executado na plataforma sensibilizada com o Mab anti-PBP2a, entretanto, de acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que os resultados falso-positivos se devem a ligação da imunoglobulina G à proteína A presente na superfície dos *Staphylococcus aureus*.

6. CONCLUSÕES

- O processo de purificação utilizado permitiu obter preparações do anticorpo monoclonal anti-PBP2a com adequada homogeneidade para emprego nos ensaios imunológicos.
- O anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi capaz de reconhecer o antígeno purificado PBP2a, mesmo em baixas concentrações, por ELISA e imunocromatografia.
- O processo de conjugação pelo método da adsorção passiva possibilitou obter o conjugado microesferas coradas x Mab anti-PBP2a para emprego na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow*.
- O fluxo das amostras bacterianas na plataforma imunocromatográfica de *Lateral Flow* foi estabelecido utilizando células lisadas de amostras bacterianas MRSA e SCN, apresentando resultado falso-positivo.
- O ensaio *Lateral Flow* empregando amostras bacterianas MRSA e MSSA apresentou resultado falso-positivo, contudo, ao utilizarmos amostras de SCN não observamos falso-positivo, provavelmente devido à proteína A, presente na superfície do *Staphylococcus aureus*, corroborando os resultados obtidos por ELISA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anvisa - Ministério da Saúde. **Boletim informativo da rede nacional de monitoramento da resistência microbiana em serviços de saúde - Rede RM - Ano III - Edição nº1**, de 10 de julho de 2009 [on line] 2009a. [capturado 04 fev 2010]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm.

Anvisa - Ministério da Saúde. **Boletim informativo da rede nacional de monitoramento da resistência microbiana em serviços de saúde - Rede RM - Ano III - Edição nº1**, de 10 de julho de 2009 [on line] 2009b. [capturado 04 fev 2010]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_dados_fig2.pdf.

Bangs Laboratories, Inc. **Adsorption to Microspheres** - Tech note 204 [on line]. 2008a. [capturado 05 maio 2010]. Disponível em: <http://www.bangslabs.com/files/bangs/docs/pdf/204>.

Bangs Laboratories, Inc. **Covalent Coupling** - Tech note 205 [on line]. 2008b. [capturado 05 maio 2010]. Disponível em: <http://www.bangslabs.com/files/bangs/docs/pdf/205>.

Bangs Laboratories, Inc. **Lateral Flow tests** - Tech note 303 [on line]. 2008c. [capturado 05 maio 2010]. Disponível em: <http://www.bangslabs.com/files/bangs/docs/pdf/303>.

Bangs LB and Meza MB. **Microspheres part 2: Ligand attachment and test formulation** [on line]. 1995. [capturado 14 agosto 2008]. Disponível em: <http://www.devicelink.com/ivdt/archive/95/04/006.html>.

Berger-Bächli B and Rohrer S. **Factors influencing methicillin resistance in Staphylococci**. Arch Microbiol 2002; 178: 165-171.

Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde**. Edição comemorativa para o IX congresso brasileiro de controle de infecção e epidemiologia hospitalar [on line]. Brasília, DF, 2004. [capturado 17 mar 2011]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf.

Brinkley M. **A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents**. Bioconjugate Chem 1992; 3: 2-13.

Cavalcante NJF. **AIDS e infecção hospitalar**. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N, editores. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000; cap 30: 683-89.

Cavalcanti SMM, França ER, Cabral C, Vilela MA, Montenegro F, Menezes D and Medeiros ACR. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital**. Braz J Infect Dis 2005; 9(1): 56-63.

Chambers HF. **Antibióticos β -lactâmicos e outros inibidores da síntese da parede celular**. In: Katzung BG, editores. **Farmacologia básica & clínica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 614-29.

Chambers HF and DeLeo FR. **Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era**. Nat Rev Microbiol 2009; 7: 629-41.

CLSI/NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: Norma aprovada – Sexta edição, documento M7-A6 2003; 23(2): 21-2.

CLSI/NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Normas de desempenho para testes de suscetibilidade antimicrobiana**; 21º suplemento informativo, documento M100-S21 2011; 31(1): 68-80.

David MZ, Boyle-Vavra S, Zychowski DL and Daum RS. **Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* as a predominantly healthcare-associated pathogen: A possible reversal of roles?** Plos One 2011; 6(4): e18217.

Del Giudice P, Blanc V, Durupt F, Bes M, Martinez J-P, Counillon E, Lina G, Vandenesch F and Etienne J. **Emergence of two populations of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with distinct epidemiological, clinical and biological features, isolated from patients with community-acquired skin infections**. Br J Dermatol 2006; 154: 118-24.

Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA and Stobberingh EE. **The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 222-35.

Fernandes AT. **Entre a fé e a ciência: a medicina na idade média**. In: Fernandes AT, Fernandes MOV, Ribeiro Filho N, editores. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000; cap 4: 43-55.

Fong WK, Modrusan Z, McNevin JP, Marostenmaki J, Zin B and Bekkaoui F. **Rapid solid-phase immunoassay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using cycling probe technology**. J Clin Microbiol 2000; 38(7): 2525-29.

Giesbrecht P, Kersten T, Maidhof H and Wecke J. ***Staphylococcal cell wall: Morphogenesis and fatal variations in the presence of penicillin.*** Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 1371–1414.

Góngora-Rubio F, Pignatari ACC, Costa LMD, Bortolloto VI, Machado AM and de Góngora DVN. ***Significância clínica, epidemiologia e microbiologia das bacteremias por estafilococos coagulase-negativos em hospital de ensino.*** Rev Ass Med Brasil 1997; 43(1): 9-14.

Grundmann H, Aires-de-Sousa M, Boyce J and Tiemersa E. ***Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat.*** Lancet Infect Dis 2006; 368: 874-85.

Hermanson GT. ***Bioconjugate Techniques.*** California: Academic Press; 1996a. p. 456-93.

Hermanson GT. ***Bioconjugate Techniques.*** California: Academic Press; 1996b. p. 593-604.

Hermanson GT. ***Bioconjugate Techniques.*** California: Academic Press; 1996c. p. 187-227.

Heukeshoven J and Dernick R. ***Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and mechanism of silver staining.*** Eletrophoresis 1985; 6: 103-12.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y and Kobayashi I. ***Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin.*** Lancet 1997; 350: 1670-73.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M and Ito T. ***The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.*** Trends Microbiol 2001; 9(10): 486-93.

Humphreys H, Grundmann H, Skov R, Lucet J-C and Cauda R. ***Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.*** Clin Microbiol Infect 2009; 15: 120-4.

Kokai-Kun JF, Chanturiya T and Mond JJ. ***Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model.*** J Antimicrobial Chem 2007; 60: 1051-59.

Korn GP, Martino MDV, Mimica IM, Mimica LJ, Chiavone PA and Musolino LRS. ***High frequency of colonization and absence of identifiable risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in intensive care units in Brazil.*** Braz J Infect Dis 2001; 5(1): 1-7.

Kohler G and Milstein C. ***Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.*** Nature 1975; 256 (5517): 495-97.

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4.** Nature 1970; 227: 680-85.

Leanne B, Gasink LB and Brennan PJ. **Isolation precautions for antibiotic-resistant bacteria in healthcare settings.** Curr Opin Infect Dis 2009; 22: 339-44.

Lencastre H. **A resistência aos antibióticos na década de 1990.** [on line]. 1999. [capturado 09 fev 2010]. Disponível em: <http://zircon.dcsa.fct.unl.pt/dspace/bitstream/123456789/256/1/23-6.PDF>.

Lim D and Strynadka NCJ. **Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Nature Struct Biol 2002; 9(11): 870-76.

Lowy FD. ***Staphylococcus aureus* infections.** N Engl J Med 1998; 339: 520-32.

Lowy FD. **Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*.** J Clin Invest 2003; 111: 1265-73.

Madigan MT, Martinko JM and Parker J. **Brock biology of microorganisms.** 10^a ed. United States of America: Prentice Hall; 2003. p. 48-101.

Matos PDM, Schuenck RP, Cavalcante FS, Caboclo RMF and Santos KRN. **Accuracy of phenotypic methicillin susceptibility methods in the detection of *Staphylococcus aureus* isolates carrying different SCCmec types.** Mem Inst Oswaldo Cruz 2010; 105(7): 931-34.

MDI – **Membranes for lateral flow tests.** [on line]. 2011. [capturado 25 mar 2011]. Disponível em: <http://www.mdimembrane.com/Pages/Immunochemistry.html>.

Mimica MJ and Mendes CMF. **Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*.** J Bras Patol Med Lab 2007; 43(6): 399-406.

Moks T, Abrahmsén L, Nilsson B, Hellman U, Sjöquist J and Uhlén M. ***Staphylococcal* protein A consists of five IgG-binding domains.** Eur J Biochem 1986; 156: 637-43.

Nelson PN, Reynolds GM, Waldron E E, Ward E, Giannopoulos K and Murray PG. **Demystified... Monoclonal antibodies.** J. Clin Pathol: Mol Pathol. 2000; 53: 111-17.

Neuhoff V, Stamm R and Eibl H. **Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis.** Electrophoresis 1985; 6 (9): 427-48.

Novagen, Inc. **Benzonase[®] Nuclease.** Instructions of Use [on line]. 1999. [capturado em 02 mar 2011]. Disponível em: http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/DNA_Removal/NOVAGEN_Benzonase.pdf

Payne WJ, Marshall DL, Shockley RK and Martin WJ. **Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies.** Clinical Microbiology Review 1988; 313-29.

Pharmacia Biotech. **PhastSystem™ – User Manual.** Uppsala (Suécia): Pharmacia LKB Biotechnology AB; 1990a. Separation Technique File nº 100.

Pharmacia Biotech. **PhastSystem™ – User Manual.** Uppsala (Suécia): Pharmacia LKB Biotechnology AB; 1990b; Separation Technique File nº 120.

Peterson GL. **Determination of total protein.** In **Methods in Enzymology.** Enzyme Structure - Part I, 1983; 91 (12): 95-105.

Posthuma-Trumpie GA, Korf J and van Amerongen A. **Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey.** Anal Bioanal Chem 2009; 393: 569-82.

Rammelkamp CH and Maxon T. **Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin.** Proc Royal Soc Exper Biol Med 1942; 51: 386-89.

Roth DM, Senna JPM and Machado DC. **Evaluation of the humoral immune response in BALB/c mice immunized with a naked DNA vaccine anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Genet Mol Res 2006; 5(3): 503-12.

Santos AL, Santos DO, de Freitas CC, Ferreira BLA, Afonso IF, Rodrigues CR and Castro HC. ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar.** J Bras Patol Med Lab 2007; 43(6): 413-23.

Scheffers DJ and Pinho MG. **Bacterial cell wall synthesis: New insights from localization studies.** Microbiol Mol Biol Rev 2005; 69 (4): 585-607.

Schwegman D. **Prevention of cross transmission of microorganisms is essential to preventing outbreaks of hospital-acquired infections.** 2009.

Science Photo Library. ***Staphylococcus aureus* bacteria** [on line]. [capturado 19 abril 2011]. Disponível em: <http://www.sciencephoto.com>.

Senna JPM, Roth DM, Oliveira JS and Machado DC. **Protective immune response against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model using a DNA vaccine approach.** Vaccine 2003; 21: 2661-66.

Sjödahl J. **Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*.** Eur J Biochem 1977; 73: 343-51.

Stapleton PD and Taylor PW. **Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation.** Sci Progr 2002; 85: 57-72.

Stewart BJ, Houghton RL, Morrow WJW and Share SR. **Design considerations for immunodiagnosics** [on line]. 2006. [capturado 20 jan 2011]. Disponível em: <http://www.ivdtechnology.com/article/design-considerations-immunodiagnosics>.

Ueno M and Jorge AOC. **Caracterização de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, envolvidos em infecções nosocomiais, por meio de técnicas fenotípicas e análise de perfil plasmidial.** Rev Biociênc 2001; 7(2): 15-22.

Vandenbergh MFQ and Verbrugh HA. **Carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical relevance.** J Lab Clin Med 1999; 133: 525-34.

Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G and Gala J-L. **Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR.** J Clin Microbiol.1995; 33: 2864–67.

Vesterberg O. **Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholytes.** Acta Chem Scand 1969; 23: 2653-66.

Walther M and Fribe A. **A guide to diagnostic rapid test development.** 1ª ed. GE Healthcare; 2008a. p. 5.

Walther M and Fribe A. **A guide to diagnostic rapid test development.** 1ª ed. GE Healthcare; 2008b. p. 18.

Walther M and Fribe A. **A guide to diagnostic rapid test development.** 1ª ed. GE Healthcare; 2008c. p. 16.

Yokoyama W. **Production of monoclonal antibodies: Induction of immune responses.** In: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, editors. **Current Protocols in Immunology.** Hoboken: Wiley and Sons; 1995; 2.5.4-2.5.8.