

Gislaine Aparecida Querino

Produção de Anticorpo monoclonal murino dirigido  
contra a PBP<sub>2a</sub> do *S. aureus* resistente a meticilina

Dissertação apresentada a Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Julio de Mesquita Filho” , Campus de  
Botucatu, para a obtenção do título de  
Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento:  
Biotecnologia Médica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Deffune

Botucatu  
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Querino, Gislaine Aparecida.

Produção de Anticorpo monoclonal murino dirigido contra a PBP2a do *S. aureus* resistente a metilina / Gislaine Aparecida Querino. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Elenice Deffune

Capes: 21202010

1. Estafilococos áureos. 2. Anticorpos monoclonais. 3. Antibióticos.  
4. Bactérias. 5. Antígeno bacteriano.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal murino; Resistência a metilina; *S. aureus*.

# *Dedicatória*

À minha família

# *Agradecimentos*

À Dra. Elenice, minha orientadora, pelos ensinamentos, pela dedicação, pelo carinho, e pela confiança em meu trabalho.

Sou sua fã número 1. Obrigada por tudo

À Soraya e à Cláudia que sempre acreditaram e torceram por mim. Vocês colocaram a Microbiologia em minha vida. Serei eternamente grata a vocês.

Ao Dr. Fábio, que acreditou em mim. Obrigada por tirar minhas estrelinhas de vez em quando. Entendi que temos que estudar sempre.

À Adriana, minha coordenadora, por permitir que eu realizasse esse trabalho. Obrigada pela força.

Aos meus colegas do laboratório por sempre respeitarem meu trabalho, e em especial à Rejane, a ex-aluna, que se tornou minha colega de trabalho e amiga. Obrigada por me apoiar e torcer por mim.

À Maira pela ajuda e incentivo. Muito obrigada

À todos do laboratório de engenharia celular, especialmente a Josy. Você foi fundamental para esse trabalho. Muito obrigada por tudo.

Que Deus a abençoe sempre!

Aos amigos do hemocentro: Tereza, Zé Roberto, Valdir, Léia, Tatá, Dr. Paulo Arbex, Dr Paulo Machado, Adaíze que me receberam com carinho, quando terminei minha graduação. Carinho esse que reencontrei agora quando retornei para o Mestrado. Muito obrigada.

À Dra Lígia, você é especial. Eu te admiro. Obrigada por ser da FIEL !!!!

Ao corpo docente do Mestrado profissionalizante . Obrigada por tudo.

À Dra Rosana e ao Dr. Alessandro por participarem da minha banca de Qualificação. Obrigada por acreditarem em meu trabalho.

À todos os colegas do mestrado, e em especial ao meu grupo de trabalho: Alessandro, Alessandra, Donald, Juliana e Leila. Foi muito bom estar ao lado de vocês .

À Janice, por sempre nos lembrar das datas e prazos, por estar sempre pronta a nos ajudar. Obrigada.

À Ana Paula, muito obrigada pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de professores.

Ao Diego, meu querido sobrinho, que sempre está a meu lado, me apoiando e me incentivando. Você é especial.

Aos meus pais, pelos esforços para garantir minha graduação. As dificuldades que passamos só me fizeram crescer como pessoa, valorizar minha profissão e ter orgulho de vocês . Obrigada por estarem sempre presente em todos os momentos de minha vida.

À minha Beatriz, que chegou junto com esse projeto, e que me deu forças para não desistir. Olhar para você, receber seu sorriso, ouvi-la chamando “mamãe”, me deram forças para continuar e terminar o Mestrado.  
Eu te amo !!!

Ao meu esposo, Luiz, que me apoiou nessa caminhada, esteve ao meu lado sempre, me fazendo companhia nas madrugadas enquanto fazia os trabalhos das disciplinas , simplesmente para não me deixar sozinha, eu agradeço.

Obrigada pela Beatriz, nosso mais precioso bem. Obrigada pelo apoio incondicional

“ Foi assim, como ver o mar, a primeira vez, que meus olhos se viram no seu olhar...”

À Deus, por sempre iluminar o meu caminho, e por ter colocado todas essas pessoas em minha vida.

# *Epígrafe*

*Muitos querem sentir o perfume das flores  
mas poucos tem a coragem de sujar  
as mãos para cultivá-las.*

*Augusto Cury*

## RESUMO

*S. aureus* é, sem dúvida, o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. O surgimento e a disseminação progressiva da resistência a meticilina tiveram grande impacto na terapia das infecções estafilocócicas. O mecanismo de resistência a meticilina desenvolvido por *S. aureus* está relacionado com a alteração das proteínas ligadoras de penicilinas, as PBPs. Os *Staphylococcus aureus* produzem 5 tipos de PBPs: 1,2,3,3', e 4. As cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina produzem uma nova PBP, a PBP2a, adquirida de outras cepas de estafilococos. Diversos métodos são utilizados para detecção da resistência a meticilina no *S. aureus*. Dentre eles, a detecção da PBP2a por meio de métodos de aglutinação em látex utilizando anticorpo monoclonal específico dirigido para o antígeno PBP2a. Na presente pesquisa, anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra a PBP2a do *S. aureus* resistente a meticilina foram produzidos através de fusão celular utilizando-se células de baço de camundongos BALB/c imunizados. Cinco fusões MRSA foram realizadas e os sobrenadantes de cultura foram triados por testes Elisa indireto. Foram construídos e testados 1236 híbridos e nove híbridos se mostraram reativos após o 4º teste de Elisa indireto. Os nove híbridos foram testados frente a diferentes bactérias para observar inibição do crescimento. Este trabalho teve como foco, a produção de anticorpo monoclonal murino para uso em testes de detecção rápida.

**Palavras-chave : Anticorpo monoclonal murino; Resistência a meticilina; *S. aureus* .**

## **ABSTRACT**

*S. aureus* is, without doubt, the most important human pathogen among staphylococci. The emergence and dissemination of progressive resistance to methicillin had great impact on therapy of staphylococcal infections. The mechanism of resistance to methicillin developed by *S. aureus* is related to the alteration of penicillin binding proteins, the PBPs. *Staphylococcus aureus* produces five types of PBPs: 1,2,3,3', and 4. Strains of *S. aureus* resistant to methicillin produce a new PBP, PBP2a the acquired from other strains of staphylococci. Several methods are used for detection of methicillin resistance in *S. aureus*. Among them, the detection of PBP2a by latex agglutination methods using monoclonal antibody specific for the antigen directed PBP2a. In the present study, murine monoclonal antibodies directed against the PBP2a methicillin resistant *S. aureus* were produced by cell fusion using spleen cells from immunized BALB / c mice. Five MRSA fusions were performed and the culture supernatants were screened by testing indirect ELISA. Were built and tested in 1236 hybrids and nine of them were reactive after the 4th indirect ELISA test. The nine hybrids were tested against different bacteria to observe inhibition of growth. This work focused on the production of murine monoclonal antibody for use in rapid detection tests.

**Keywords:** murine monoclonal antibody; Resistance to methicillin; *S. aureus*



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Microbiota normal do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>16</b>
<b>Figura 2</b> - Distribuição do <i>Staphylococcus aureus</i> no indivíduo normal e patogênese do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>17</b>
<b>Figura 3</b> - Estrutura do <i>S. aureus</i> .....	<b>18</b>
<b>Figura 4</b> - Fatores de virulência do <i>Staphylococcus aureus</i> .....	<b>19</b>
<b>Figura 5</b> - Estrutura da metilina.....	<b>20</b>
<b>Figura 6</b> - Produção da PBP2a.....	<b>21</b>
<b>Figura 7</b> – Representação gráfica das cadeias leves e pesadas das Imunoglobulinas.....	<b>23</b>
<b>Figura 8</b> - Esquema de obtenção de anticorpos monoclonais pela tecnologia dos hibridomas.....	<b>24</b>
<b>Figura 9</b> - Características dos anticorpos.....	<b>25</b>
<b>Figura10</b> - Esquema da produção do antígeno.....	<b>28</b>
<b>Figura 11</b> – Esquemática do teste ELISA indireto.....	<b>34</b>
<b>Figura 12</b> – Eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, gradiente 4-12, do antígeno preparado, em diferentes concentrações, corado por nitrato de Prata.....	<b>41</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Número de híbridos reagentes, pelo teste ELISA indireto, nos 4 testes seqüenciais.....**44**
- Gráfico 2** – Desempenho dos 9 AcMm obtidos frente às cepas de MRSA, MSSA, *P. aeruginosa* e *E. coli*, em microbiologia.....**47**
- Gráfico 3** – Desempenho do teste de inibição com a incorporação dos 9 AcMm em placas de cultura com cepa de *S. aureus* resistente a meticilina.....**48**
- Gráfico 4** – Desempenho do teste de inibição com a incorporação dos 9 AcMm em placas de cultura com cepa de *S. aureus* sensível a meticilina ATCC 25922 .....**49**
- Gráfico 5** – Desempenho do teste de inibição com a incorporação dos 9 AcMm em placas de cultura com cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.....**49**
- Gráfico 6** – Desempenho do teste de inibição com a incorporação dos 9 AcMm em placas de cultura com cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.....**50**

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Quadro 1** - Padrão de reatividade, segundo a densidade ótica, no teste ELISA, como critério para manutenção dos híbridos secretores.....**35**
- Tabela 1** - Diferentes protocolos de fusão, número de placas distribuídas, número de híbridos construído, número de híbridos testados e taxa de eficiência da fusão.....**42**
- Tabela 2** - Número de híbridos selecionados nos quatro testes de *screening* consecutivos por ELISA indireto.....**43**
- Tabela 3** - Diferentes reatividades apresentadas pelos híbridos secretores de imunoglobulinas anti-extrato de *S.aureus* (MRSA) no quarto teste de triagem por ELISA indireto.....**45**
- Tabela 4** – Contagem das UFCs, em cultura de diferentes bactérias, em triplicata, na presença ou ausência de complemento, com a adição dos anticorpos monoclonais obtidos *versus* taxa de inibição de crescimento.....**53**

## SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Quadros e Tabelas

1. Introdução.....	14
2. Revisão de Literatura.....	16
3. Objetivos.....	26
4. Material e Métodos.....	27
4.1 Identificação de cepas de <i>S. aureus</i> resistente a metilina.....	27
4.2 Obtenção do extrato antigênico.....	28
4.2.1 Determinação da concentração protéica.....	29
4.2.2 Caracterização do extrato antigênico.....	29
4.3 - Produção de anticorpos monoclonais murinos.....	29
4.3.1 – Imunização dos camundongos.....	31
4.3.2 – Células de Fusão.....	31

<b>4.3.3 Fusão Celular.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3.4. Seleção dos hibridomas (Triagem).....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.5 – Expansão dos híbridos em cultura.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.6 – Viabilidade Celular.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.7 Testes microbiológicos.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>40</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Perspectivas.....</b>	<b>55</b>
<b>8. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>61</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*S. aureus* (*S. aureus*) é, sem dúvida, o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. São cocos gram positivos, catalase positiva e coagulase positiva. (Konemman, 2001). Colonizam narinas, períneo, pregas cutâneas e axilas, produzindo infecções oportunistas em condições apropriadas. As manifestações clínicas vão desde infecções traumáticas até septicemias. (Souza, 2005). Tornaram-se um desafio as novas terapias antimicrobianas em virtude da crescente resistência aos antimicrobianos, principalmente pela presença de um conjunto de mecanismos de virulência (Stapleton, 2002).

A resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* é determinada por mutações em seus genes e/ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou eventualmente de outras espécies. Em 1960 a meticilina foi lançada no mercado como uma alternativa terapêutica para cepas produtoras de penicilinas; mas em 1961, começaram relatos de cepas resistentes a meticilina. (Rossi e Andreazzi, 2005). O surgimento e a disseminação progressiva da resistência a meticilina e outras penicilinas semissintéticas (como a oxacilina) tiveram grande impacto na terapia das infecções estafilocócicas (Trabulsi, 2005).

O mecanismo de resistência a meticilina desenvolvido por *S. aureus* está relacionado com a alteração das proteínas ligadoras de penicilinas, as PBPs. *S. aureus* produzem 5 tipos de PBPs: 1,2,3,3', e 4. As cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina produzem uma nova PBP, a PBP2a, adquirida de outras cepas de estafilococos (Lopes, 2005).

As infecções hospitalares por estafilococos resistentes aumentam a morbidade e a mortalidade dos pacientes internados com significativo aumento do custo de internação hospitalar.

A identificação rápida de MRSA é especialmente importante em cenários nos quais haja necessidade de rápida tomada de medidas preventivas ou terapêuticas, como nas Unidades de Terapia Intensiva (U.T.I.), e em algumas

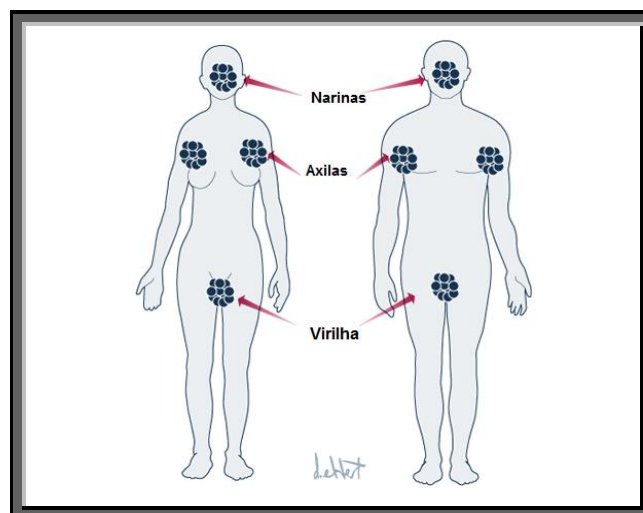
intervenções cirúrgicas que dependam de substituições de próteses. A oxacilina é a droga representante das PPR - *penicilina-penicilinase resistente*, indicada para detectar a resistência do *S. aureus in vitro*, por ser a mais resistente a degradação e a mais sensível para a detecção da heteroresistência. (Rossi e Andreazzi, 2005). Diversos métodos são utilizados para detecção da resistência a oxacilina no *S.aureus*. Um método com sensibilidade próxima a 100%, é a detecção da PBP2a por meio de métodos de aglutinação em látex. (Cavassini, 1999; Bressler, 2005). O teste de aglutinação em látex, utiliza anticorpo monoclonal específico dirigido para o antígeno PBP2a. Vários estudos demonstram que este teste deve ser incorporado a rotina do laboratório de microbiologia por ser mais rápido (20 minutos). (Cuevas, 2003; Chapin, 2004).

Com o crescente aumento do MRSA em nossos hospitais, o laboratório de microbiologia deve ser capaz de identificar com maior rapidez bactérias com esse perfil de resistência, promovendo como consequência o início precoce da terapêutica adequada e o efetivo controle da disseminação dessa bactéria no ambiente hospitalar, através de protocolos da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar para o isolamento de pacientes portadores de MRSA. Frente às dificuldades de aquisição de insumos biotecnológicos, ao elevado custo e a importância da correta identificação do MRSA para a microbiologia hospitalar, a produção de ferramenta diagnóstica agilizará a confirmação dos casos suspeitos e conduta terapêutica específica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Descrição da bactéria

As bactérias do grupo *Staphylococcus* fazem parte da família Micrococcaceae; possuem 33 espécies, sendo 17 delas isoladas de amostras biológicas. São cocos gram positivos, catalase positiva. Algumas dessas espécies de estafilococos patogênicos para o homem e para os animais produzem uma enzima denominada coagulase e a detecção dessa enzima é realizada em laboratório para identificar esse microorganismo. Entre os estafilococos, a espécie coagulase positiva *S. aureus* e duas espécies coagulase negativa, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* são encontrados em maior frequência em infecções humanas. *S. aureus* é, sem dúvida, o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. São encontrados no ambiente externo e em narinas anteriores de 20 a 40 % dos adultos. Outros sítios de colonização incluem pregas cutâneas, períneo, axilas e vagina. (Konemman, 2001) (Figura 1).

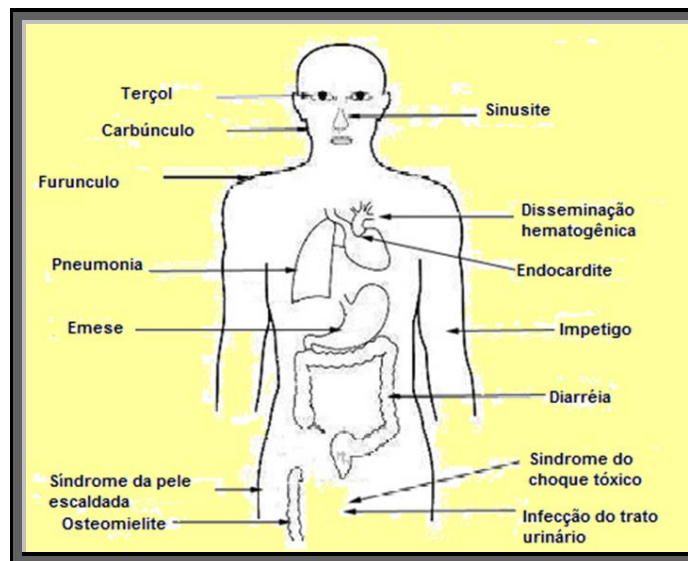


Fonte: : textbookofbacteriology.net , Querino modificado, 2012

**Figura 1** - Microbiota normal do *S. aureus*



Embora esse microorganismo faça parte da microbiota humana normal, pode produzir infecções oportunistas importantes em condições apropriadas. (Diab, 2008). Os fatores que podem predispor um indivíduo a infecções graves por *S. aureus* incluem alterações quimiotáticas dos leucócitos, alterações na opsonização por anticorpos, alterações na destruição intracelular das bactérias após fagocitose, lesões cutâneas, presença de corpos estranhos e administração profilática ou terapêutica de agentes antimicrobianos (Figura 2).

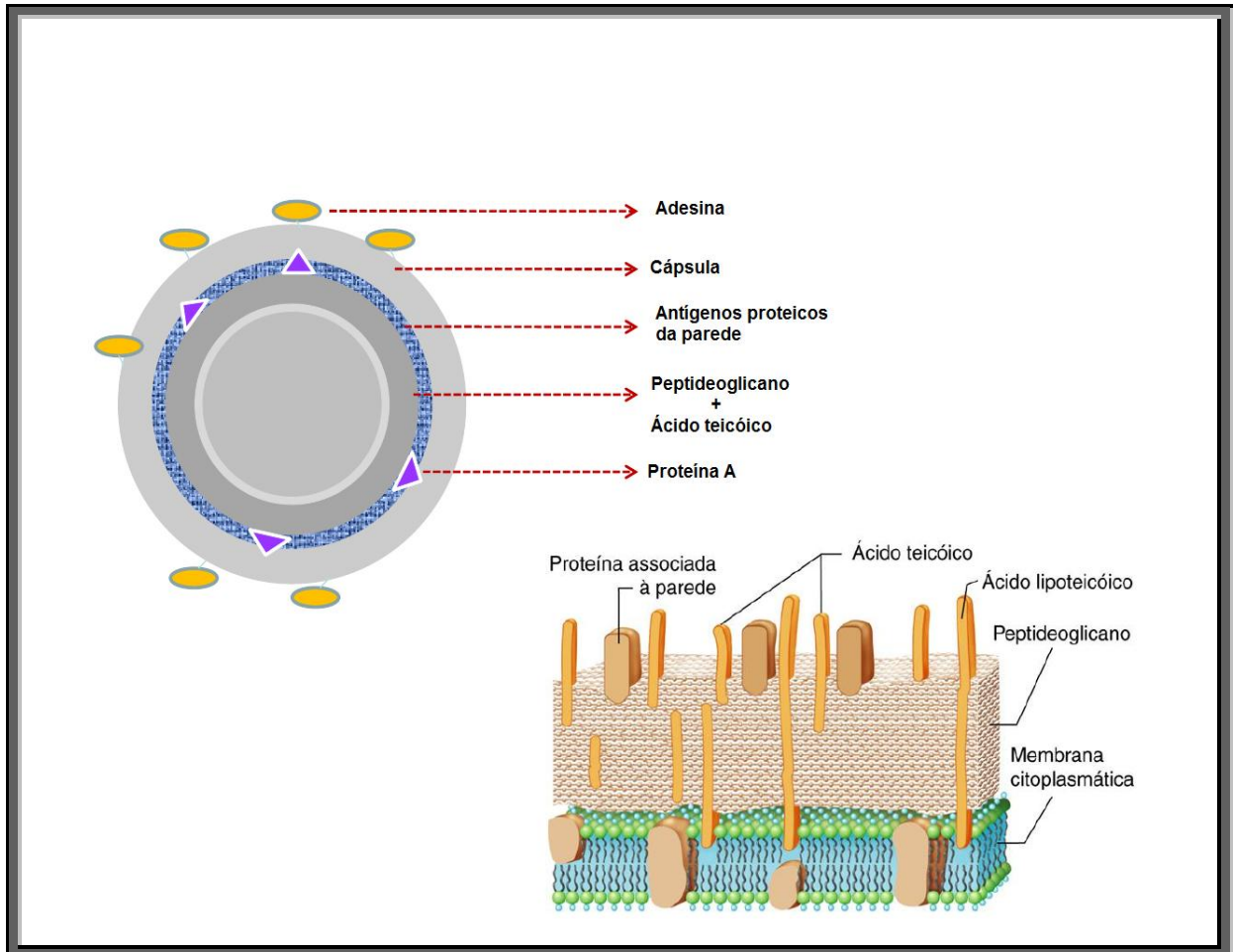


Fonte: textbookofbacteriology.net, Querino modificado, 2012

**Figura 2** - Distribuição do *S. aureus* no indivíduo normal e patogênese do *S. aureus*

## 2.2 - Estrutura da bactéria

O *S. aureus* possui na sua estrutura alguns componentes que favorecem a sua virulência no organismo do hospedeiro. Esta estrutura é composta por diferentes proteínas, entre elas a adesina, na cápsula, outros antígenos de parede, uma extensa camada de peptidoglicano e ácido teicóico, além da proteína A que apresenta alta afinidade por imunoglobulinas (Figura 3).

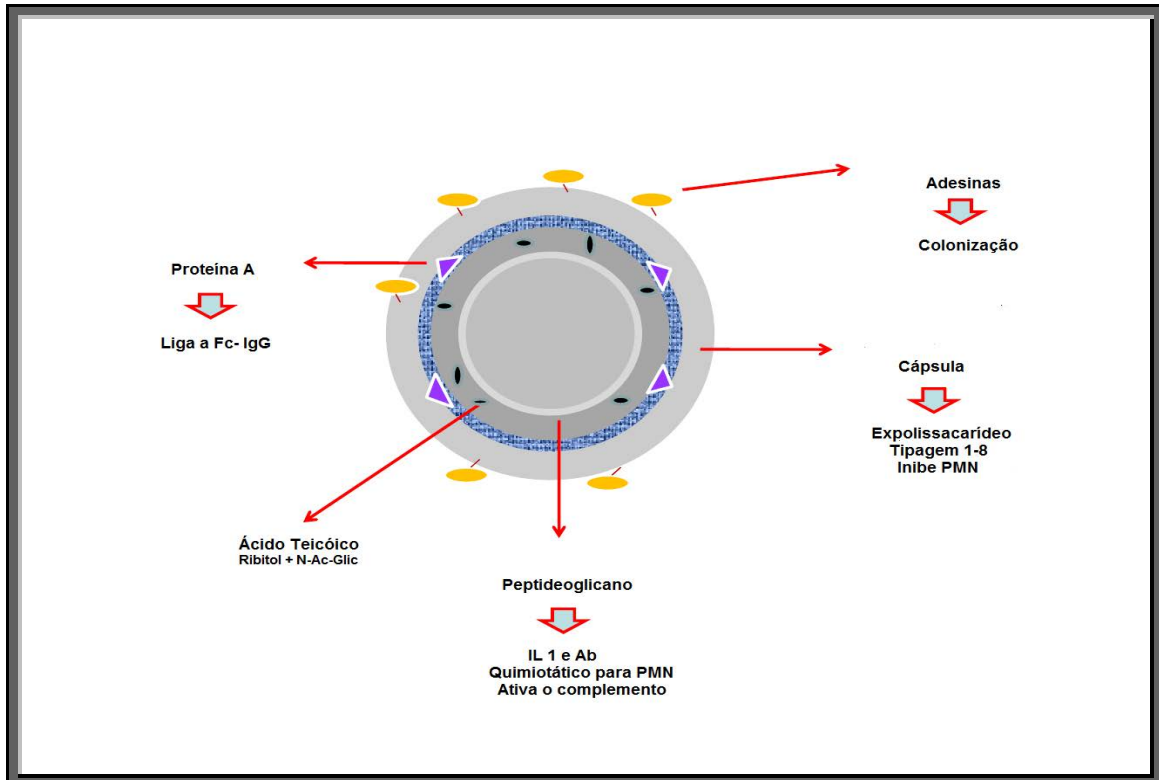


Fonte: [http://dc399.4shared.com/doc/rMZolA\\_z/preview.html](http://dc399.4shared.com/doc/rMZolA_z/preview.html)

**Figura 3** - Estrutura do *S. aureus*

### 2.3 - Fatores de virulência

*S. aureus* é considerado um dos principais patógenos causadores de infecções no ambiente hospitalar. As manifestações clínicas vão desde infecções traumáticas até septicemias (Souza, 2005) e pela presença de um conjunto de mecanismos de virulência (Figura 4) que influi no desenvolvimento de resistências a antibióticos (Trabulsi, 2005) tornaram-se um desafio às novas terapias antimicrobianas (Stapleton, 2002).

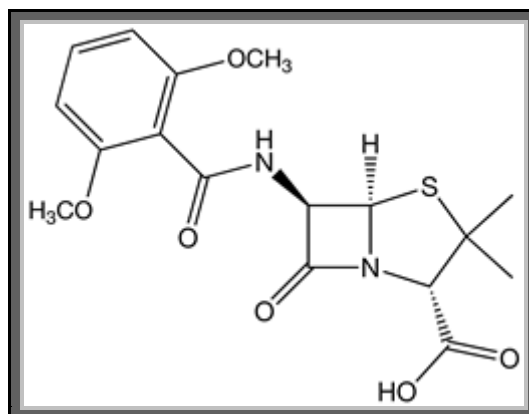


Fonte: : [http://dc399.4shared.com/doc/rMZoIA\\_z/preview.html](http://dc399.4shared.com/doc/rMZoIA_z/preview.html)

**Figura 4** - Fatores de virulência do *S. aureus*

## 2.4 - Aparecimento da multiresistência

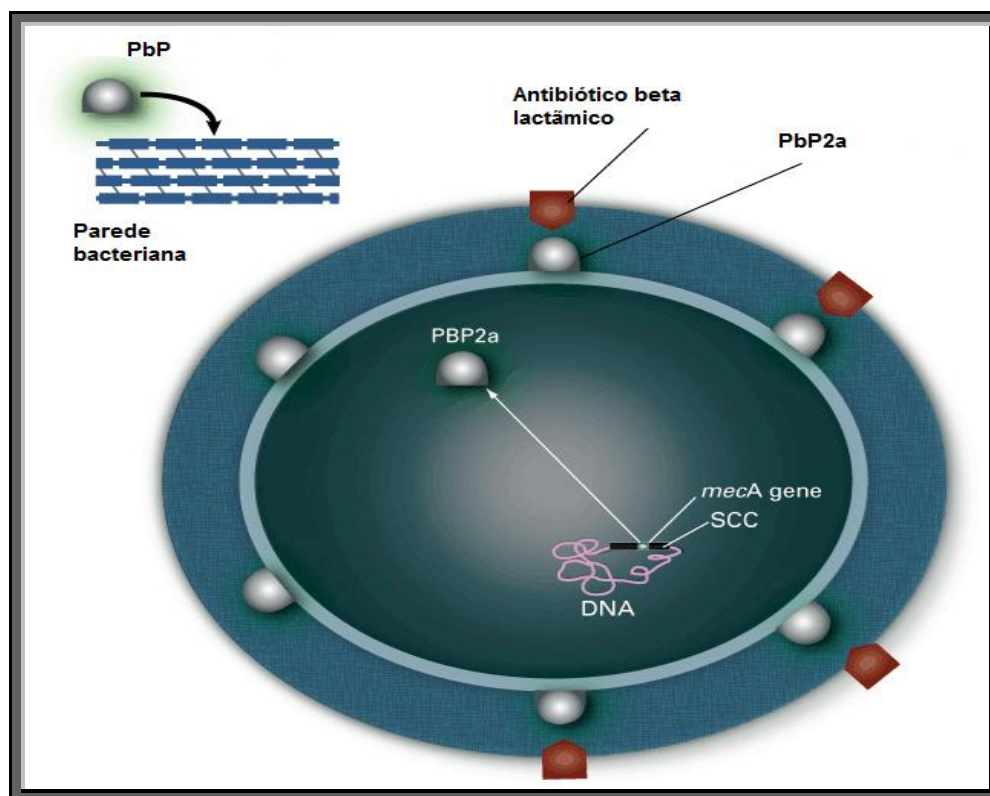
A resistência aos antimicrobianos em *S. aureus* é determinada por mutações em seus genes e/ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie ou eventualmente de outras espécies. (Konemman, 2001). Em 1960 a metilina (Figura 5) foi lançada no mercado como uma alternativa terapêutica para cepas produtoras de penicilinas; mas em 1961, começaram relatos de cepas resistentes a metilina. (Rossi e Andreazzi, 2005).



Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Methicillin.png>

**Figura 5** - Estrutura da meticilina

O surgimento e a disseminação progressiva da resistência a meticilina e outras penicilinas semissintéticas (como a oxacilina) tiveram grande impacto na terapia das infecções estafilocócicas (Trabulsi, 2005). O primeiro isolado de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina foi descrito na Inglaterra em 1961. (Barber, 1961). O MRSA aparece quando o *Staphylococcus* sensível a meticilina adquire um cassete cromossômico *Staphylococcus mec* – SCCmec. Os SCCmec tem sido identificados em *S. aureus*, e em outros coagulase positivos além de *Staphylococcus coagulase negativa*. SCCmec é transmitido entre as espécies de estafilococos como um elemento genético móvel. Há vários tipos de SCCmec, mas todos tem dois componentes essenciais: o complexo gene mec contendo o gene **mecA** que codifica a proteína ligadora de penicilina 2' (PBP2') com reduzida afinidade aos beta lactâmicos e o complexo gene ccr, que codifica recombinases sitio específicas. O mecanismo de resistência a meticilina desenvolvido por *S. aureus* está relacionado com a alteração das proteínas ligadoras de penicilinas, as PBPs. *S. aureus* produzem 5 tipos de PBPs: 1,2,3,3', e 4. As cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina produzem uma nova PBP, a PBP2a, adquirida de outras cepas de estafilococos. (Lopes, 2005) (Figura 6).



Fonte: <http://depts.washington.edu/hivaid/derm/case6/discussion.html>, Querino modificado, 2012

**Figura 6** : Produção da PBP2a

## 2.5 - Identificação do MRSA

A identificação rápida de MRSA é especialmente importante em cenários nos quais haja necessidade de rápida tomada de medidas preventivas ou terapêuticas, como nas Unidades de Terapia Intensiva (U.T.I.), e em algumas intervenções cirúrgicas que dependam de substituições de próteses. (Zurita *et al*, 2010). Com o surgimento dos CA-MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina de origem comunitária) a identificação precoce também é necessária para evitar a transmissão de resistência na comunidade (Davis e Daum, 2010)

Diversos métodos são utilizados para detecção da resistência a oxacilina no *S. aureus*. Entre eles, estão os testes de disco difusão com cefoxitina, a determinação da concentração inibitória mínima, as placas de *screening* com oxacilina (CLSI, 2011), métodos automatizados, meios cromogênicos, métodos de

aglutinação em látex e a detecção por métodos moleculares (padrão ouro).(Mimica, 2007; Kaiser, 2010). Entretanto a utilização desse último método não está amplamente disponível nos laboratórios. A utilização de métodos moleculares é mais rápida, com resultados liberados entre 2 a 6 horas, mas com alto custo por exame. (Van Hall *et al*, 2007) .Um método com sensibilidade próxima a 100%, é a detecção do produto do gene *mecA*, a PBP2a por meio de métodos de aglutinação em látex. (Cavassini 1999; Bressler, 2005). O teste de aglutinação em látex, utiliza anticorpo monoclonal específico dirigido para o antígeno PBP2a. Vários estudos demonstram que este teste deve ser incorporado a rotina do laboratório de microbiologia por ser mais rápido (20 minutos) (Cuevas, 2003; Chapimin, 2004). O tempo de identificação completa do MRSA é de 72 horas. (Iorio, 2007). A escolha por métodos fenotípicos de detecção de resistência a oxacilina é o do baixo custo do exame (Van Leeuwen, 1999), embora sejam mais demorados. O teste de aglutinação em látex é mais rápido, mas é mais caro. Comparando-se os testes fenotípicos mais utilizados em laboratórios de microbiologia e o teste em látex, os resultados são satisfatórios. A sensibilidade para identificação dos MRSA pelo teste de látex pode variar de 100% (Ulloa, 2001; Cuevas, 2003 ; Bressler, 2005), 99,5% (Jafri, 2000), 99% (Mohanasoundaram , 2008 ) e 97% (Van Leeuwen ,1999).

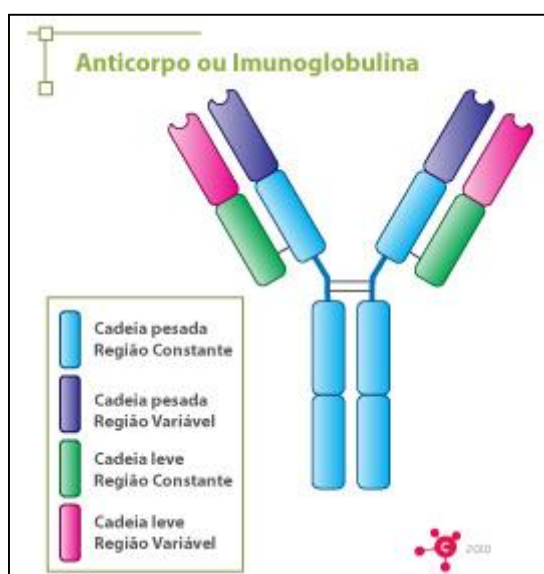
## **2.6 - Impacto do MRSA no controle da infecção**

Com a disseminação do MRSA, é necessário a adoção de programas de vigilância envolvendo a avaliação do perfil de sensibilidade dos isolados. Além disto, o desenvolvimento de métodos rápidos e confiáveis para sua detecção proporcionando a escolha da terapêutica adequada (Diab, 2008), e também para o controle da infecção hospitalar (Ulloa, 2001) tem sido alvo de pesquisas constantes. As cepas MRSA usualmente apresentam resistência a outros grupos de drogas indicadas para o tratamento de infecções provocadas por estafilococos, como clindamicina, eritromicina, tetraciclina, gentamicina e sulfametoxazol-trimetropim. (Rossi e Andreazzi, 2005). Pacientes colonizados por MRSA na admissão hospitalar tem maior risco de aquisição de infecções (Davis, 2004). O MRSA aumenta o tempo de internação do paciente e também a letalidade. (Moreira, 1998; Hurley, 2003). As

infecções hospitalares alcançam uma problemática de grande importância para a saúde pública à medida que interferem na assistência médica repercutindo em grandes custos, elevado número de internações e acentuada taxa de mortalidade. (Silva, 2003) .

## 2.7 - Anticorpos monoclonais

Anticorpos monoclonais são importantes ferramentas imunológicas por possuírem especificidade de ligação, homogeneidade, e capacidade de serem produzidos em grande quantidade. Sua estrutura é bem conhecida dispondo de cadeias pesadas e leves (Figura 7).

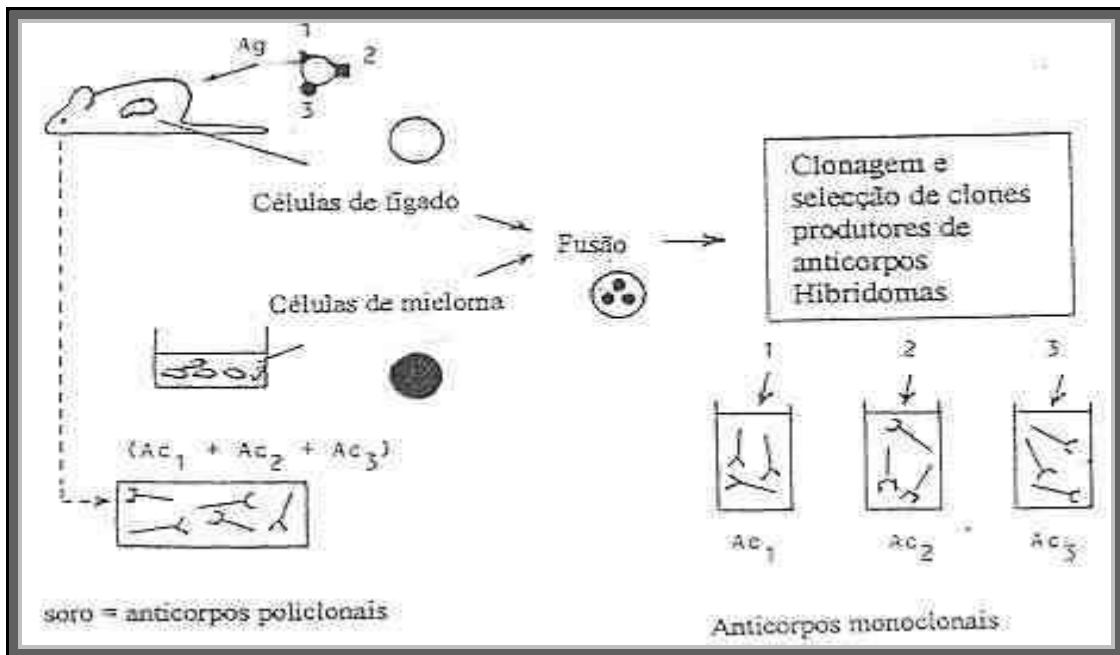


Fonte: [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n9/fig\\_tab/nrmicro974\\_F1.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n9/fig_tab/nrmicro974_F1.html), Querino modificado, 2012

**Figura 7** – Representação gráfica das cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas

Köhler e Milstein descreveram em 1975 a tecnologia de anticorpos monoclonais murinos (AcMm). Este método envolve a fusão de linfócitos B de animais previamente imunizados com o antígeno de interesse com células neoplásicas em fase exponencial de crescimento (mieloma múltiplo). Dessa fusão, resultam células denominadas hibridomas. (Figura 8). Uma das principais vantagens

sobre a produção dos hibridomas é que antígenos não purificados podem ser utilizados para a produção de anticorpos específicos (Harlow e Lane, 1988).

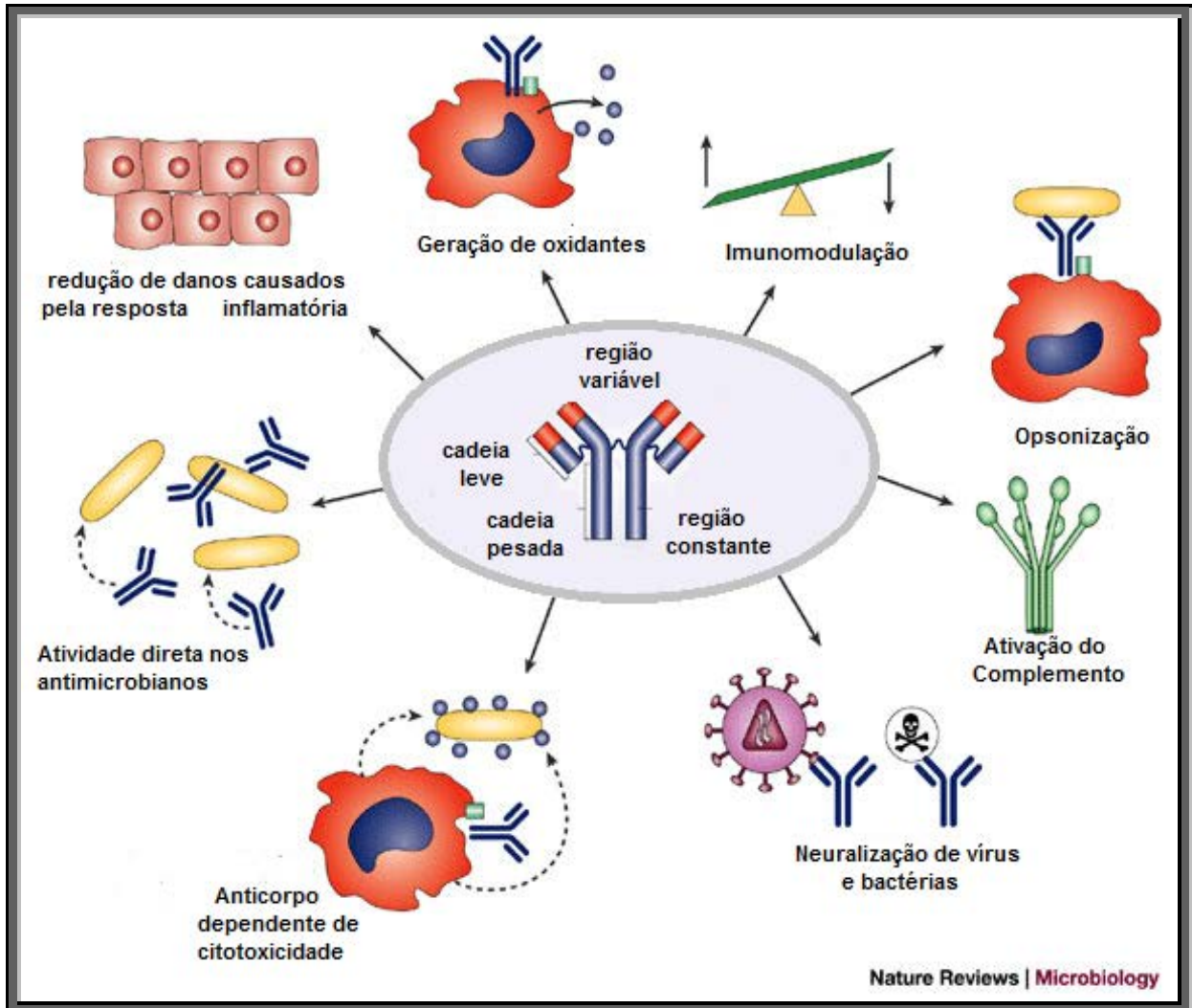


Fonte: Kohler e Milstein, 1975

**Figura 8** - Esquema de obtenção de anticorpos monoclonais pela tecnologia dos hibridomas

Os anticorpos monoclonais apresentam diferentes maneiras de ação, entre elas fixando ou não o complemento, reduzindo a resposta inflamatória, ação dependente de citotoxicidade, entre outras (Figura 9).





Fonte: [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n9/fig\\_tab/nrmicro974\\_F1.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n9/fig_tab/nrmicro974_F1.html), Querino modificado, 2012

**Figura 9** : Características dos anticorpos

Analisando a figura acima publicada da Nature Reviews pode-se avaliar o impacto da geração dos anticorpos monoclonais murinos aplicados em microbiologia. Este trabalho justifica-se pelo fato de que os anticorpos monoclonais disponíveis no mercado são de alto valor agregado, restringindo a ampla utilização. A produção nacional, além de promover a capacitação de capital intelectual, tem como objetivo a consolidação de pesquisadores na área e a independência tecnológica. Este trabalho teve como foco, a produção de anticorpo monoclonal murino para uso em testes de detecção rápida.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Produção de anticorpos monoclonais anti-PBP-2a do *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⇒ Produção de extrato antigênico a partir de cepas conhecidas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina
  
- ⇒ Identificação dos híbridos secretores de imunoglobulinas pelo método ELISA indireto
  
- ⇒ Análise do desempenho dos anticorpos obtidos frente à diferentes bactérias

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa obteve a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, com protocolo CEEA 976-2012. (Anexo 1).

As etapas iniciais da pesquisa foram :

- 1 – Identificação de cepas de *S. aureus* resistente a metilina;
- 2 – produção do extrato antigênico e a
- 3 – produção de AcMm.

### 4.1 – Identificação de cepas de *S. aureus* resistente a metilina

A parte microbiológica deste experimento foi realizada no Serviço de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Estadual de Bauru(HEB). O Laboratório de Microbiologia analisa em média 100 amostras/dia, tem a certificação ONA nível 2 e participa de controle de qualidade externo PNCQ. Nos Procedimentos Operacionais Padrão instituídos, as cepas utilizadas no controle de qualidade interno (CQI) são adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC), certificada ISSO 17025 desde 2005 e ISO 9001 desde 2008 e ISSO Guide 34 desde 2009, configurando-se instituição de renome e respeitabilidade na área de atuação.

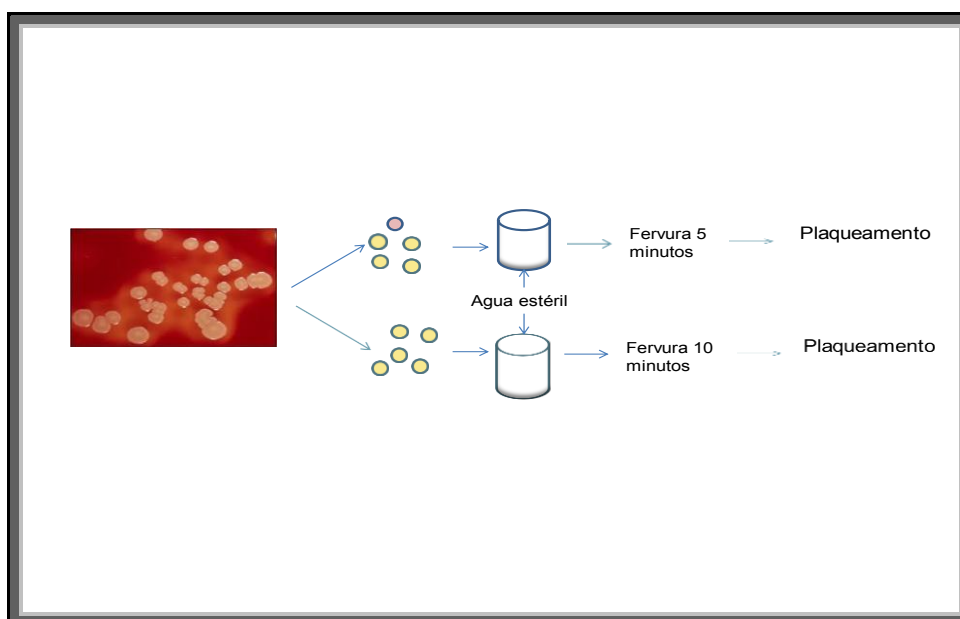
A cepa de escolha para a produção do antígeno, apresentou crescimento no ágar Manitol e no ágar Sangue e ausência de crescimento no ágar MacConkey. No ágar Manitol, houve o crescimento de colônias amarelas e no ágar Sangue, o crescimento de colônias com beta-hemólise. Foi realizada a coloração de Gram das colônias das duas placas, e foram observadas ao microscópio cocos gram positivos, isolados e agrupados. Realizou-se então a prova da catalase com colônias do ágar Manitol, e o resultado da prova foi positivo. De acordo com Koneman (2001), com esses resultados, as colônias suspeitas pertencem ao gênero *Staphylococcus spp.*

Para identificar o *Saphylococcus aureus* , foi realizada a prova da coagulase, utilizando coagulasma (Laborclin, lote 20504013, val.: 24/04/13) de acordo com as instruções do fabricante. A identificação da bactéria também foi confirmada pelo sistema MicroScan (Siemens) .

Para verificar a resistência a metilina, procedeu-se a realização do antibiograma pelo método de disco-difusão, utilizando-se o disco de cefoxitina 30µg/ml (Oxoid) além de um disco de oxacilina 1µg/ml (Cecon) e também a utilização de painel positivo do equipamento MicroScan, que realiza o teste de sensibilidade através de microdiluição, para cefoxitina e oxacilina. (CLSI, 2012)

#### 4.2 Obtenção do extrato antigênico

Aproximadamente 20 colônias de *S. aureus* semeado em uma placa de ágar sangue foram colocados em 2 tubos com 10ml de água estéril cada; um tubo foi submetido a fervura por 5 minutos em seguida foi efetuado o plaqueamento em uma placa de ágar sangue pela técnica quantitativa. O outro tubo foi submetido a fervura por mais 10 minutos e plaqueado em outra placa de ágar Sangue para observar inibição ou não do crescimento (Blanco et al., 1997).



**Figura10** - Esquema da produção do antígeno

#### **4.2.1 – Determinação da concentração protéica**

Determinou-se a concentração protéica do antígeno em espectrofotômetro (Nanodrop1000®) de acordo com as instruções do fabricante.

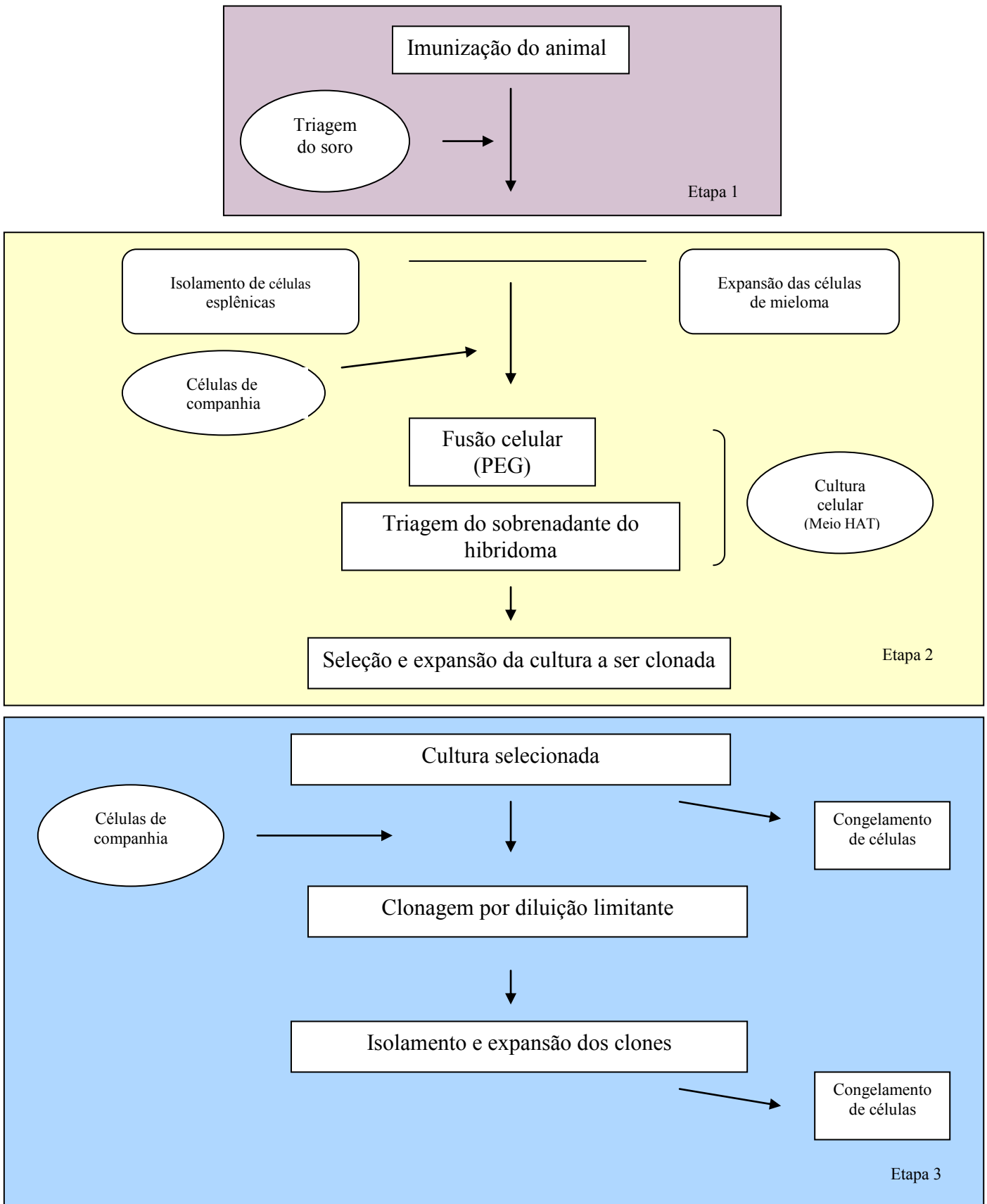
#### **4.2.2 – Caracterização do extrato antigênico**

A caracterização do antígeno foi realizada através da separação em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) com gel de separação de gradiente 4 a 12 % (Hames e Rickwood, 1998) . Foram testadas concentrações de 30 a 80µg, na proteína nativa e com a proteína desnaturada. Um padrão de peso molecular (Sigma® - S8445) foi incluído para facilitar a identificação. Finalizada a corrida, o gel foi deixado sob agitação em solução corante de Azul de Coomassie e contra-corado com nitrato de prata.

#### **4.3 - Produção de anticorpos monoclonais murinos**

A produção de anticorpos monoclonais murinos envolveu 3 etapas identificadas no fluxograma a seguir:

## Fluxograma da produção de anticorpos monoclonais



#### 4.3.1 – Imunização dos camundongos

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, com 21 dias de vida, peso médio de 16,0g, fêmeas, provenientes do Biotério Central da UNESP e mantidos no Biotério do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias em condições controladas por bioterista e médico veterinário. Os animais receberam banho com loção acaricida com deltametrina, 4 dias consecutivos, de forma preventiva, antes do procedimento de imunização, tendo em vista que a presença de ácaros pode comprometer e perder o processo de cultura celular subsequente.

Denominou-se a sigla **MRSA** como nome do protocolo utilizando o extrato antigênico. Esta denominação respeita a nomenclatura estabelecida pela Sociedade Internacional de Hibridomas, que orienta que o nome do protocolo remeta ao antígeno.

Foram utilizados 6 animais no protocolo de imunização. Todos os camundongos receberam a mesma fonte de antígeno na dose de 40mg/kg sendo que o adjuvante de imunização foi o sulfato potássico de alumínio dodecahidrato ( $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ ). Foram utilizadas 2 vias diferentes de inoculação: via intraperitoneal (IP) e endovenosa (EV), com inoculação do antígeno pela veia caudal.

Como o objetivo do trabalho é o da obtenção de AcMm para compor teste rápido, optou-se por protocolo de imunização denominado rápido, onde foram realizadas em D0 a primeira injeção intraperitoneal com adjuvante, a segunda injeção foi em D15 e a denominada injeção de reforço ou *booster*, sem adjuvante foi realizada em D30. Três dias após o *booster*, foram realizadas as fusões celulares.

### 4.3.2 – Células de Fusão

Como parceiras de fusão foram utilizadas as células de mieloma múltiplo murino da linhagem NS/1, obtidas por Köhler e Milstein (1975), provenientes do *Laboratoire de Genie D'Institute National de Transfusion Sanguine* (INTS) de Paris, integrante da *Agence Française Du Sang*, mantidas em nitrogênio líquido (DEFFUNE et al, 1996).

As células NS/1 foram descongeladas 8 dias antes da fusão segundo Deffune (1992) e mantidas em crescimento com meio de cultura, em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento das células foi acompanhado até a observação de viabilidade igual ou superior a 90% por coloração azul de tripano (*Tripan Blue* 0,4%) em microscópio óptico.

### 4.3.3 Fusão Celular

A fusão celular foi realizada segundo a técnica descrita por Köhler e Milstein (1975) com modificações de Deffune (1992). Após as duas primeiras imunizações realizadas com intervalo de 15 dias, os animais receberam um reforço final por via endovenosa (15 dias após a segunda imunização) sem adjuvante, 5 dias antes da fusão. No dia da fusão, os camundongos foram anestesiados com anestésico tiopental sódico (40mg/kg) para a esplenectomia e, em seguida, eutanasiados com o mesmo fármaco na dose de 60-80mg/kg de peso animal por via intraperitoneal. Cada baço foi manipulado separadamente em capela de fluxo laminar para a perfuração da cápsula esplênica e remoção dos linfócitos. O procedimento de fusão foi realizado por co-centrifugação dos linfócitos recém coletados de cada animal imunizado juntamente com células NS/1 na proporção de 1/10 e o agente fusionante polietilenoglicol PM 4000 (PEG) (1,0 mg de PEG para cada 100 x 10<sup>6</sup> células NS/1 + linfócitos). Em seguida, as células foram distribuídas em microplacas de cultura celular de 96 cavidades, contendo meio enriquecido (ME) em aminoácidos essenciais e não essenciais, e soro fetal bovino (SFB) a 20%.



A seleção enzimática dos híbridos foi realizada dentro do sistema hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT)( Köhler e Milstein (1975) pela utilização do meio seletivo HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) a partir do dia seguinte à fusão. Este meio possibilita a seleção através da proliferação dos hibridomas (linfócito B + NS/1) e a eliminação das células não fusionadas.

Como a fusão é aleatória, é possível ocorrer três situações distintas: a fusão de mieloma com linfócitos B (objetivo dos protocolos de fusão), linfócitos B não fusionados ou fusionados entre si e mieloma múltiplo não fusionado ou fusionado ao acaso entre si. Para evitar a segunda e terceira ocorrência, é necessário selecionar as células fundidas. A segunda situação é auto-limitada, pois as células linfocitárias estão normalmente em apoptose programada e serão eliminadas da cultura durante os processos de repicagem. Entretanto a terceira situação é preocupante, pois como o mieloma se divide rapidamente em cultura, dificulta a seleção dos hibridomas. Assim, utilizam-se propriedades do genoma do mieloma incluindo a hipermetilação e a deficiência de uma enzima do sistema hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT), uma das enzimas da via de recuperação da síntese de nucleotídeos. Células normais são HGPRT positivas, enquanto o genoma do mieloma é HGPRT negativo. Para regular esta etapa, utiliza-se a seleção enzimática dos hibridomas através do sistema HGPRT. Assim, 24 horas após a fusão é adicionado meio de cultura contendo suplemento Hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT). A aminopterina bloqueia a via *de novo*, restando somente a via de recuperação a ser utilizada para a formação de nucleotídeos. No entanto, a hipoxantina pode ser utilizada na síntese somente por células HGPRT positivas, ou seja, hibridomas e linfócitos. Os mielomas contêm a proteína HGPRT não funcional e morrem nessas condições. Os linfócitos não fusionados possuem morte programada, o que permite a viabilidade na cultura somente dos hibridomas (Harlow e Lane, 1988)

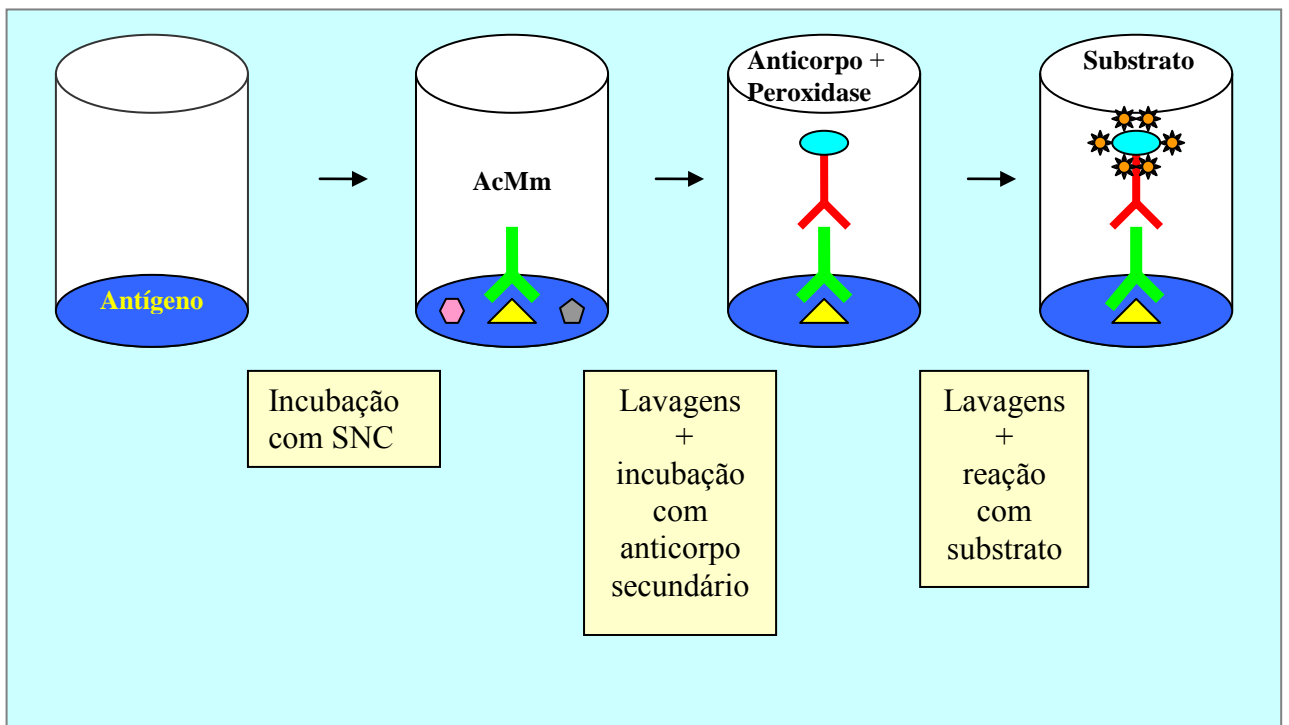
Três dias após a fusão, foram adicionados à cultura dos hibridomas as células de companhia (*feeders cells*), células oriundas de timo de camundongo de até 20 dias de vida, na quantidade de  $1 \times 10^5$  células por cavidade da placa. A finalidade é suplementar o meio de cultura com fatores de crescimento, importantes para o desenvolvimento dos híbridos recém construídos (Gordon, 1988 ;Davis,

1994). Além disso, os timócitos facilitam a visualização do crescimento dos hibridomas por possuírem tamanho menor.

#### 4.3.4. Seleção dos hibridomas (Triagem)

A partir da fusão, a observação em microscópio invertido permitiu o monitoramento diário das células. As cavidades onde houve proliferação celular e confluência de 95 a 100% foram marcadas para a coleta dos sobrenadantes de cultura (SNC). Todos os SNC foram coletados no da do teste, quando houvesse passado no mínimo 48 horas sem troca de meio de cultura, favorecendo o aumento da concentração de imunoglobulinas.

Os SNC foram coletados e testados por ELISA indireto (Figura 11 ) para determinar a presença de anticorpos específicos contra os antígenos utilizados na imunização dos camundongos. (Vicentini-Oliveira et al, 2010)



**Figura 11** – Esquematização do teste ELISA indireto

O antígeno obtido das cepas de *S. aureus* multiresistentes foi fixado nas microplacas de fundo chato na concentração de 100µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  0,2M - pH 9,6) por 1 hora a 37°C e em seguida por 12 horas a 4°C. O bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com 200µl de tampão de saturação PBS (0,14M NaCl 1,4M  $\text{K}_2\text{PO}_4$  8mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  2,7 mM KCl) pH 7,4 + 5% de leite em pó desnatado por 1 hora a temperatura ambiente.

Os SNC das células obtidas (100µl) foram aplicados na placa de ELISA, assim como os controles negativos. Foram utilizados 2 controles negativos: um controle com 100µl de meio de cultura estéril e outro com 100 µl de soro de camundongo pré-imunização diluído em tampão de bloqueio (1:1000). O controle positivo utilizado foi 100µl de soro de camundongo imunizado diluído em tampão de bloqueio (1:1000) . O anticorpo secundário utilizado para detectar os anticorpos murinos IgG foi o anticorpo anti-mouse conjugado a peroxidase diluídos em tampão de bloqueio (1:10.000) . A solução cromógena utilizada foi o TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Abbot®) . A medida da intensidade da reação foi realizada análise espectrofotométrica em aparelho leitor de microplacas com filtro de 450nm. Entre as etapas foram realizadas sucessivas lavagens com PBS pH 7,4 adicionado de 0,1% de Tween 20. A reação foi paralisada com 100µl de HCl 1N. As células cujos sobrenadantes apresentaram-se reagentes frente ao antígeno, foram expandidas para volumes crescentes de meio de cultura e os respectivos sobrenadantes testados por mais três vezes por ELISA indireto. Aquelas que se mantiveram reagentes até o quarto teste foram clonadas.

No POP do Laboratório de Engenharia celular do Hemocentro de Botucatu encontra-se definido o padrão de reatividade frente ao teste ELISA e a retenção dos hibridomas (Quadro 1).

<b>Caracterização da reatividade</b>	<b>Critério</b>
Baixa reatividade	D.O. teste : 3x D.O. do controle negativo
Média reatividade	D.O. teste : > 3x e < 10x D.O. do controle negativo
Alta reatividade	D.O. teste : > 10x D.O. do controle negativo

**Quadro 1** - Padrão de reatividade, segundo a densidade ótica, no teste ELISA, como critério para manutenção dos híbridos secretores

São selecionados híbridos levando em consideração o padrão de reatividade que corresponde à densidade ótica no teste ELISA e o aspecto das células em cultura: sem a infiltração fibroblástica, sem a presença de células com deposição enegrecida e com boa curva de crescimento. Híbridos que não possuam estas características, apesar de secretores de uma imunoglobulina de interesse, podem não se tornar viáveis na fase de ampliação clonal.

#### **4.3.5 – Expansão dos híbridos em cultura**

Os híbridos selecionados na primeira triagem foram expandidos conforme preenchem as cavidades da microplaca de cultura de 96 poços. Assim, as células foram repicadas para placas de 24 poços e, posteriormente para frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, ao mesmo tempo em que as triagens subseqüentes eram realizadas. Então as células que mantiveram a reatividade até o quarto teste foram congeladas em solução de SFB contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), seguido de imersão em nitrogênio líquido para assegurar sua conservação, segundo Deffune et al (1996).

Após o congelamento em ampolas, cada híbrido foi semeado em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> para expansão denominada “*batch* de cultura”, em que o material permanece em cultivo por um período de 8 dias sem troca de meio de cultura, conseguindo-se assim, maior liberação de anticorpos. As células em apoptose separadas por centrifugação foram desprezadas e o sobrenadante de cultura congelados em tubos devidamente identificados para posterior análise.

#### 4.3.6 – Viabilidade Celular

Para garantir o sucesso da clonagem celular, foi realizada a estimativa de viabilidade dos hibridomas pela coloração Azul de Tripán a 0,4%. Em microscopia óptica as células vivas aparecem claras e brilhantes, pois a membrana plasmática íntegra exclui o corante. As células mortas ou em degeneração, ao contrário, incorporam o corante e aparecem maiores e com coloração azulada, devido a fragmentação da membrana plasmática. Assim, o resultado foi expresso em porcentagem de células viáveis, segundo a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{n}^\circ. \text{ de células vivas} \times 100}{\text{n}^\circ. \text{ células vivas} + \text{n}^\circ. \text{ células mortas}}$$

#### 4.3.7 Testes microbiológicos

##### 4.3.7.1 - Preparo do meio de cultura:

A realização dos testes microbiológicos foi feita com quatro tipos de bactérias diferentes. As bactérias gram positivas de escolha foram *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* resistente a metilina integrante do banco de cepas do laboratório de microbiologia do Hospital Estadual Bauru . As bactérias gram negativas utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. As bactérias gram positivas foram semeadas em ágar Manitol e as bactérias gram negativas, semeadas em ágar MacConkey.

Ágar Manitol

O meio de cultura foi preparado seguindo todos os procedimentos de preparo de meios de cultura do setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Estadual Bauru .

Para o preparo de 360 ml de ágar Manitol, foi utilizado o agar BBL™ Manitol Salt Agar (lote 2212378, validade 30/04/2016). De acordo com a orientação do fabricante, após a pesagem do ágar e diluição com água deionizada o material foi dissolvido e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após a retirada da autoclave, o meio de cultura foi dividido em três (3) alíquotas. À primeira alíquota adicionou-se o anticorpo (1,0 mg/ml do meio), à segunda alíquota adicionou-se o anticorpo (1,0 mg/ml do meio) e 5% de fonte de complemento; à terceira alíquota, nada foi adicionado. Como fonte de complemento, foi coletado sangue humano sem anticoagulante, o qual foi centrifugado e o soro congelado a -20°C até o momento do uso. Após homogeneização, cada alíquota foi plaqueada placas de petri descartáveis de plástico de 90mm de largura, sendo colocado 20 ml de agar em cada placa. O controle de qualidade do meio de cultura foi feito com a cepa ATCC 25923 de *S. aureus* , seguindo os procedimentos de rotina do setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Estadual Bauru. Após a validação, procedeu-se a semeadura das bactérias nas placas com anticorpo e com anticorpo e complemento. As bactérias semeadas foram *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* resistente a metilina

#### Ágar MacConkey:

O meio de cultura foi preparado seguindo todos os procedimentos de preparo de meio de cultura do setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Estadual Bauru.

Para o preparo do ágar MacConkey, foi utilizado o agar Difco™ MacConkey Agar (lote 1364761, validade 30/9/2016). De acordo com a orientação do fabricante, após a pesagem do agar e diluição com água deionizada; o material foi dissolvido e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após a autoclavação, o meio de cultura foi dividido em três (3) alíquotas. À primeira alíquota adicionou-se o

anticorpo (1,0 mg/ml do meio ), à segunda alíquota adicionou-se o anticorpo (1,0 mg/ml do meio) e 5% de fonte de complemento; à terceira alíquota, nada foi adicionado. Como fonte de complemento, foi coletado sangue humano sem anticoagulante, o qual foi centrifugado e o soro congelado a -20°C até o momento do uso. Após homogeneização, cada alíquota foi plaqueada em placas de petri descartáveis de plástico de 90mm de largura, sendo colocado 20 ml de agar em cada placa. O controle de qualidade do meio de cultura foi feito com a cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* , seguindo os procedimentos de rotina do setor de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Estadual Bauru. Após a validação, procedeu-se a semeadura das bactérias nas placas com anticorpo e com anticorpo e complemento. As bactérias semeadas foram *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

#### **4.3.7.2 - Semeadura das bactérias**

A semeadura foi realizada pela técnica quantitativa, utilizando alças de plástico descartáveis de 1,0µl.e em triplicata.

A quantidade de inóculo de cada bactéria foi padronizada, seguindo a escala 0,5 de MacFarland, com uma concentração aproximada de 10<sup>8</sup> UFC/ml.

Para cada bactéria semeada, foi feito um controle semeando a bactéria em meio de cultura sem anticorpo e sem complemento.

As placas foram incubadas por 24 horas, observadas e depois foram reincubadas por mais 24 horas, totalizando um período de 48 horas de incubação.

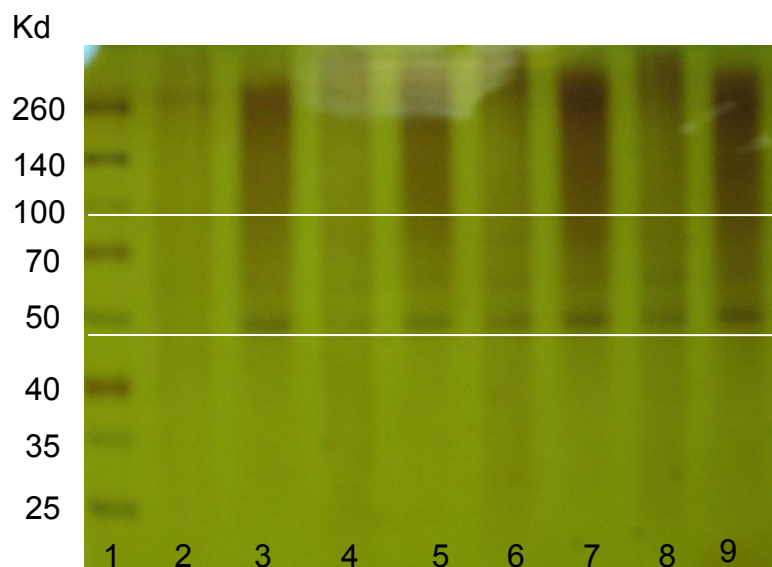
Foi efetuada a leitura das placas, e o resultado foi expresso em UFC/ml.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As cepas de *S. aureus* multiresistentes foram submetidas à fervura em dois diferentes tempos: 5 e 10 minutos. O controle de qualidade do material submetido a fervura de 5 minutos evidenciou o crescimento de colônias após a incubação de 48 horas, tornando este procedimento proibitivo para uso como antígeno de imunização, pois o intuito não foi o de infectar os animais, mas sim, de provocar a resposta imune contra proteínas específicas. Na segunda técnica utilizada, em que a fervura foi de 10 minutos não houve crescimento de colônias após a incubação de 48 horas, tendo sido esta a metodologia utilizada para a produção do antígeno. Após o processamento das amostras, a determinação protéica realizada no equipamento Nanodrop® evidenciou uma concentração de 2,25mg/ml.

A caracterização do antígeno obtido foi realizado por eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE (Hames e Rickwood, 1998) gradiente 4-12, corado por Blue de Coomassie e contra-corado com nitrato de prata. Foram testadas concentrações de 30 a 80µg, na proteína nativa e com a proteína desnaturada. (Figura 12).





Pistas: 1 = Marcador de peso molecular; 2= MRSA nativo 30µg; 3= MRSA desnaturado 30µg;4=MRSA nativo 50 µg; 5=MRSA desnaturado 50µg;6=MRSA nativo 70µg;7=MRSA desnaturado 70µg;8= MRSA nativo 80µg e9= MRSA desnaturado 80µg

**Figura 12** – Eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, gradiente 4-12, do antígeno preparado, em diferentes concentrações, corado por nitrato de prata

As bandas identificadas estão entre 80 e 50 Kda. O desempenho na eletroforese é maior quando a concentração do antígeno é igual ou superior a 70µg/ml. Diversos autores descrevem a PBP2a como sendo composta de 668 amino ácidos, com peso molecular variando entre 78 Kda, para outros 76,1 Kda e é esta proteína PBP2a que tem baixa afinidade pelos antibióticos  $\beta$  lactâmicos. Ela possui uma porção solúvel de peso molecular 74 Kda (Lim e Strynadka, 2002). O resultado obtido confirma as características químicas da proteína em estudo.

Foram realizados 5 fusões celulares a partir do protocolo **MRSA** utilizando o antígeno preparado. Um dos animais imunizados (6) não foi utilizado para a fusão celular pois apresentou sinais de escoriações por brigas dentro da gaiola, desenvolvendo infecção de pele, o que poderia determinar contaminação na cultura celular. Estas 5 fusões geraram 24 placas de 96 poços distribuídas com a construção de 2.111 híbridos, dos quais, 1.236 deles (58,5%) foram testados (Tabela 1). O menor desempenho nos testes foi no protocolo MRSA 5, que apesar de ter sido construídos 434 híbridos, em 15 dias, foram testados 161 deles, perfazendo um percentual de híbridos testados neste protocolo de 37,1% . O melhor desempenho foi no protocolo MRSA1 seguido do MRSA4. com 78,5% e 63,4% de

desempenho respectivamente. Os dados referentes ao desempenho dos testes estão acima da média estabelecida no próprio Laboratório.

**Tabela 1** - Diferentes protocolos de fusão, número de placas distribuídas, número de híbridos construído, número de híbridos testados e taxa de eficiência da fusão

Fusão	Nº. de placas de 96 poços	Nº. de híbridos construídos	Nº. de híbridos testados	% de híbridos testados
<b>MRSA 1</b>	6	534	419	78,5
<b>MRSA 2</b>	5	430	248	57,7
<b>MRSA 3</b>	4	336	169	50,3
<b>MRSA 4</b>	4	377	239	63,4
<b>MRSA 5</b>	5	434	161	37,1
<b>TOTAL</b>	<b>24</b>	<b>2111</b>	<b>1236</b>	<b><math>\bar{x} = 57,4</math></b>

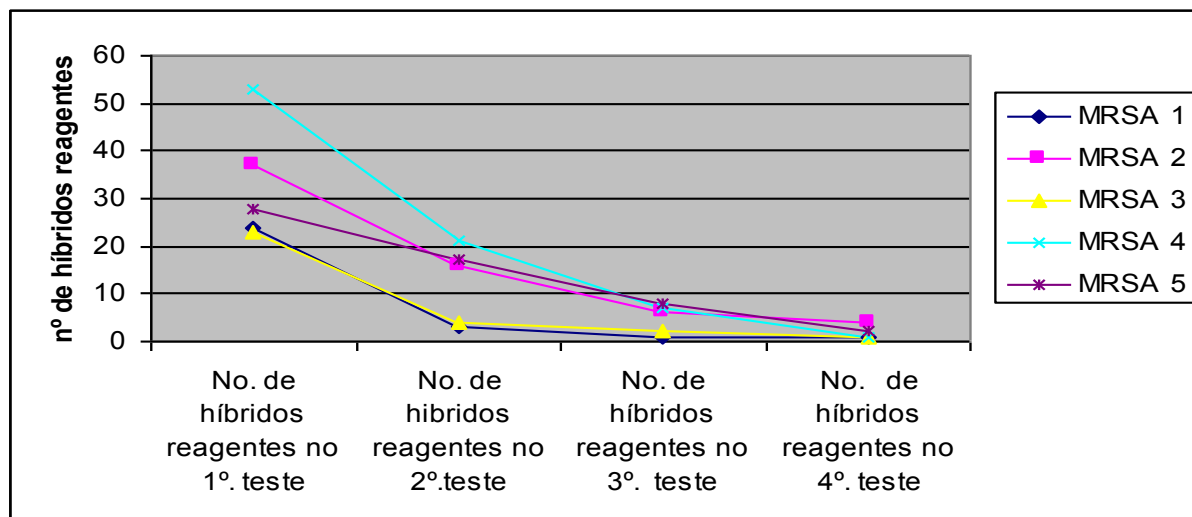
Três dias após a fusão, iniciou-se a observação diária das placas de cultura dos híbridos que se desenvolveram e a triagem foi realizada pela técnica de ELISA indireto.

Após o primeiro teste de ELISA indireto, dos 1.236 construídos e testados, 165 híbridos foram reagentes, ou seja, 13,34% dos híbridos testados no primeiro ELISA mostraram-se reagentes. Os híbridos selecionados foram expandidos por passagens celulares (repicagem) e submetidos a um segundo, terceiro e quarto testes. Esta seqüência se faz necessária para a avaliação dos híbridos estáveis, ou seja, aqueles que apesar de muitas divisões celulares mantêm sua atividade secretora. Desta forma, o desempenho dos testes foi de 61, 24 e 9 híbridos reagentes (no 2º., 3º. e 4º. re-testes, respectivamente) (Tabela 2 e Gráfico 1)

**Tabela 2** - Número de híbridos selecionados nos quatro testes de *screening* consecutivos por ELISA indireto

<b>Fusão</b>	<b>Nº. de híbridos testados</b>	<b>Nº. de híbridos reagentes no 1º. teste</b>	<b>Nº. de híbridos reagentes no 2º. teste</b>	<b>Nº. de híbridos reagentes no 3º. teste</b>	<b>Nº. de híbridos reagentes no 4º. teste</b>
<b>MRSA 1</b>	419	24	03	01	01
<b>MRSA 2</b>	248	37	16	06	04
<b>MRSA 3</b>	169	23	04	02	01
<b>MRSA 4</b>	239	53	21	07	01
<b>MRSA 5</b>	161	28	17	08	02
<b>TOTAL</b>	<b>1.236</b>	<b>165</b>	<b>61</b>	<b>24</b>	<b>09</b>

O gráfico 1 registra o declínio, teste a teste, do número de híbridos testados. Isto é esperado, pois existem re-arranjos cromossômicos das células recém criadas, que no momento da divisão celular podem sofrer exclusão, perdendo assim sua capacidade secretora. Harlow e Lane registram a reatividade média de 1 híbrido a cada 1500 testados como sendo o esperado mundialmente. Os resultados obtidos nestes protocolos realizados estão acima da média mundial, em função de modificações da técnica clássica estabelecidas no Laboratório, alcançando resultados até 10 vezes superiores (Harlow e Lane, 1988; Catty, 1988).



**Gráfico 1** – Número de híbridos reagentes, pelo teste ELISA indireto, nos 4 testes sequenciais

A partir dos resultados obtidos na última triagem, os híbridos foram separados em 3 grupos de acordo com a reatividade da capacidade secretora apresentada por cada híbrido frente ao antígeno e denominados com baixa, média e alta reatividade. A Tabela 4 apresenta as faixas de densidade ópticas (DO) compreendidas para os 3 grupos, bem como o número de híbridos positivos nesse teste. Observa-se que apenas 1 AcMm possui alta reatividade ( $DO > 1.000$ ). Caso seja considerado os resultados de alta reatividade, o resultado obtido é compatível com aquele descrito por Harlow e Lane (1988). No entanto, sabe-se que anticorpos com menor reatividade podem ter efeito somatório interessante e desejável no momento da composição de kits diagnósticos, pela diferença de classe de imunoglobulina, avidéz pelo antígeno entre outras características.

**Tabela 3** - Diferentes reatividades apresentadas pelos híbridos secretores de imunoglobulinas anti-extrato de *S.aureus* (MRSA) no quarto teste de triagem por ELISA indireto

<b>Fusão</b>	<b>Nº. de híbridos reagentes</b>	<b>Baixa reatividade (DO ≤ 0.499)</b>	<b>Média reatividade (0.500 &gt; DO &lt; 0.999)</b>	<b>Alta Reatividade (DO &gt; 1.000)</b>
<b>MRSA 1</b>	1	0	0	1
<b>MRSA 2</b>	4	4	0	0
<b>MRSA 3</b>	1	1	0	0
<b>MRSA 4</b>	1	0	1	0
<b>MRSA 5</b>	2	2	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

Após o resultado da segunda triagem os híbridos confirmados como reagentes foram transferidos para placas de 24 cavidades e em seguida para frascos de 25cm<sup>2</sup>. Ocasionalmente, durante o processo de expansão celular, híbridos selecionados no teste de ELISA indireto (Renukaradhya et al, 2004) que não apresentaram crescimento satisfatório foram eliminados do experimento.

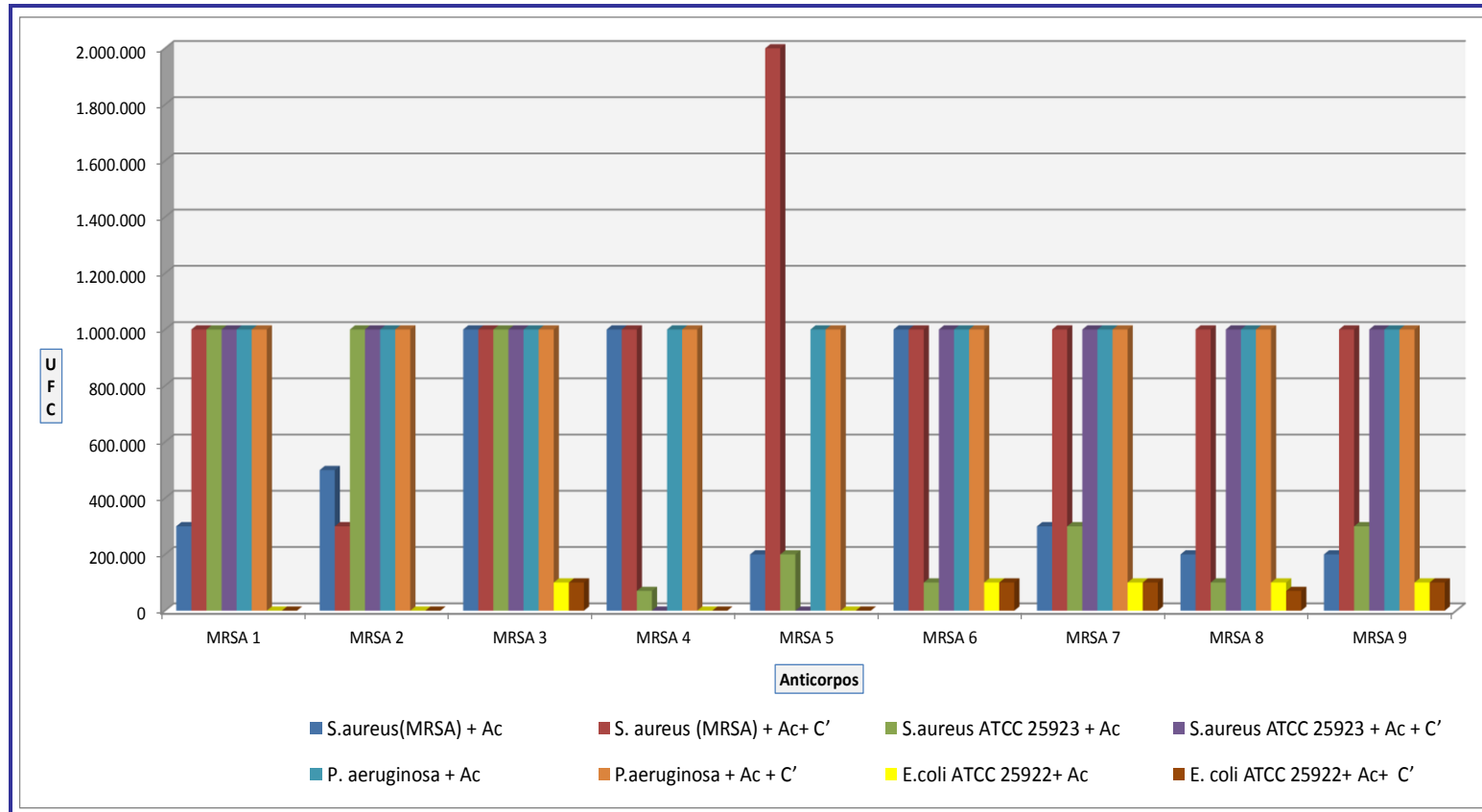
Nessa fase, os híbridos (9) que apresentaram expansão satisfatória em cultura e manutenção da reatividade em ELISA indireto foram congelados e mantidos em nitrogênio líquido para a constituição do banco de células.

Os nove (9) híbridos que se mostraram reativos após o 4º. Teste de Elisa indireto foram testados frente a diferentes bactérias para observar inibição ou não do crescimento.

Os meios de cultura e a semeadura foram executados como descrito anteriormente e os testes foram realizados em triplicata. Os anticorpos receberam a

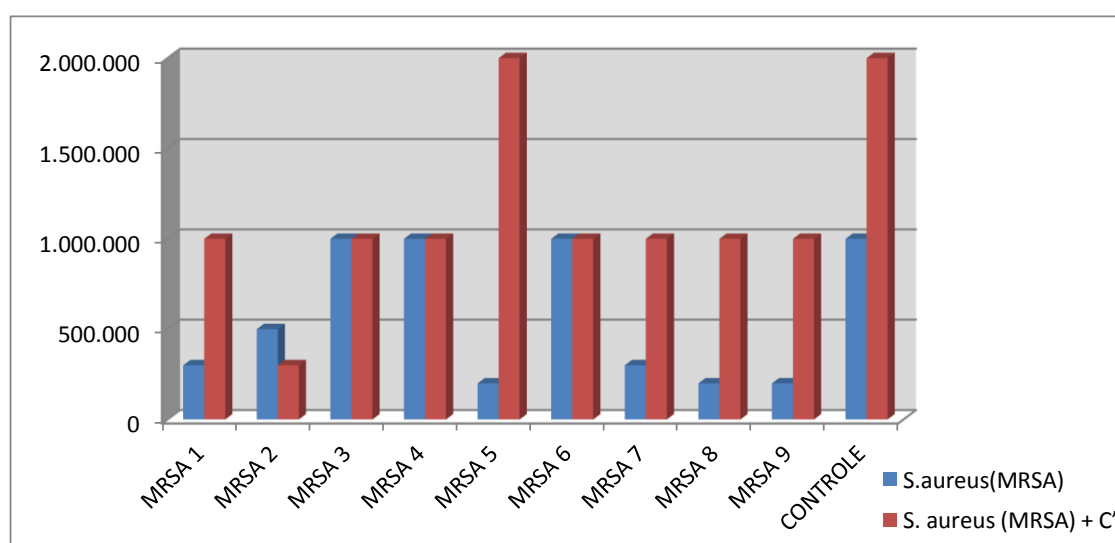
denominação de MRSA de 1 a 9, e para todos os testes foram executados controle com as bactérias com e sem a presença de fonte de complemento, tendo em vista as diferentes formas de ação dos anticorpos monoclonais. O Gráfico 2, do tipo histograma, mostram os resultados obtidos. Como pode ser observado, dentre os 9 AcMm testados, encontram-se aqueles que inibem o crescimento de bactérias de forma diferenciada, e um deles, o MRSA 5, apesar de inibir o *S. aureus* resistente a metilina (MRSA), com a incorporação do complemento no meio de cultura o mesmo apresentou um fenômeno de estímulo ao crescimento bacteriano, representando um híbrido que não poderá ser utilizado com finalidades clínicas ou terapêuticas (Gráfico 2).

Para facilitar o entendimento e o perfil dos anticorpos, os mesmos foram analisados separadamente com cada cepa utilizada, com e sem adição de complemento e com a presença do AcMm de 1 a 9, comparados com a cultura controle sem a adição de anticorpo monoclonal, na presença e na ausência do complemento. Os anticorpos foram aplicados na concentração de 1mg/ml. No eixo **x** estão representadas as unidades formadoras de colônias e no **y**, o desempenho dos nove anticorpos testados.



**Gráfico 2** – Desempenho dos 9 AcMm obtidos frente às cepas de MRSA, MSSA, *P. aeruginosa* e *E. coli*, em microbiologia

A análise da cultura com cepas metilina resistente, mostram que os anticorpos 1,2,7,8 e 9 apresentam inibição de crescimento sem a fonte de complemento em relação ao controle; com a adição do complemento, a situação não se modificou, pois em relação ao controle, houve inibição de crescimento. Os anticorpos 3, 4 e 6 apresentaram inibição do crescimento apenas na presença do complemento. O anticorpo 5, apresentou um perfil diferente em relação aos outros anticorpos, inibindo o crescimento da bactéria sem o complemento, mas com crescimento idêntico ao controle quando houve a adição da fonte de complemento. (Gráfico 3)

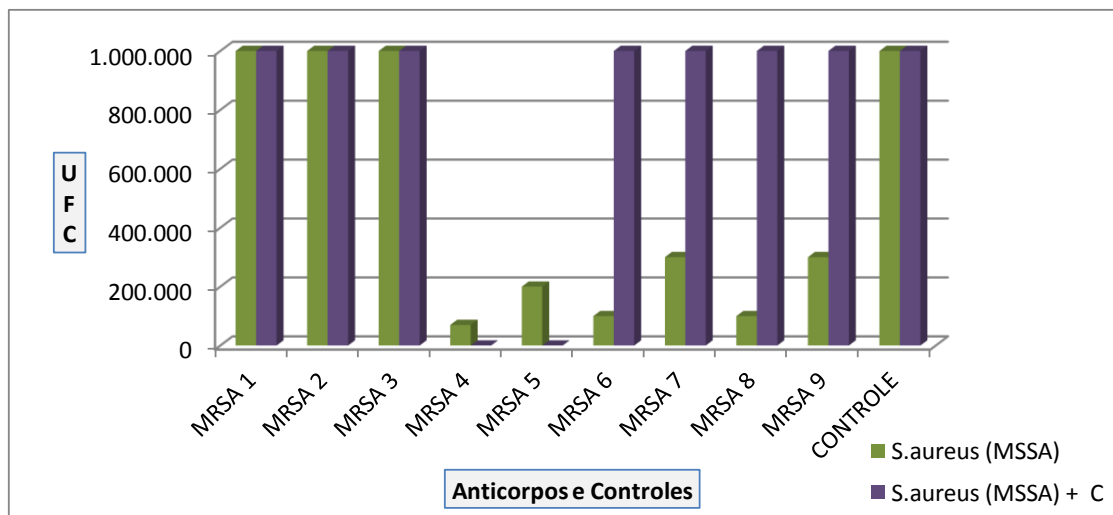


C= complemento

**Gráfico 3** – Desempenho do teste de inibição com a incorporação dos 9 AcMm em placas de cultura com cepa de *S. aureus* resistente a metilina

A análise da cultura com cepas metilina sensíveis, mostram que os anticorpos 4 e 5 apresentam reação cruzada, com inibição do crescimento bacteriano sem a presença de complemento, e com total inibição na presença do complemento. O anticorpo 6, e 8 apresentam perfil semelhante com inibição do crescimento quando não ocorre a adição de complemento, no entanto, em presença do mesmo, comportam-se como a curva controle (Gráfico 4).

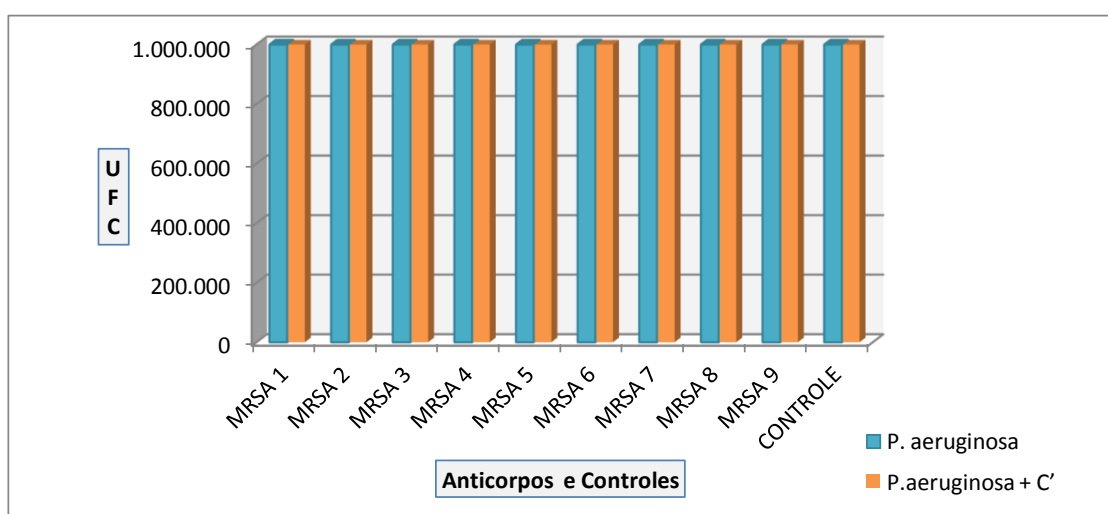




C= complemento

**Gráfico 4** – Desempenho do teste de inibição com a incorporação dos 9 AcMm em placas de cultura com cepa de *S. aureus* sensível a meticilina ATCC 25922

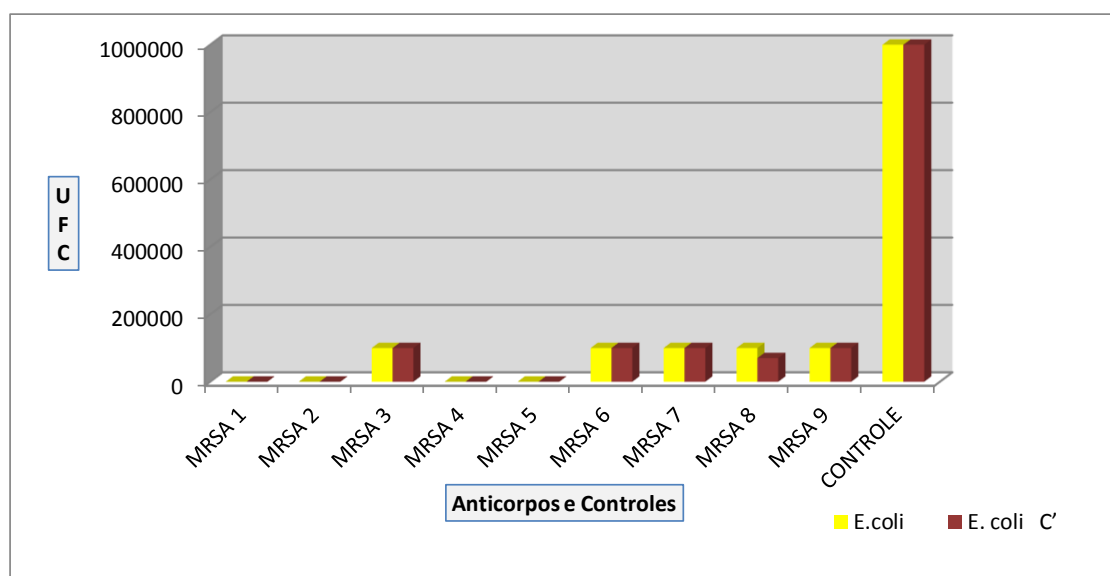
A análise da cultura com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 mostra que não houve inibição de crescimento em relação aos controles com todos os anticorpos testados, reforçando o fato de que a proteína extraída (antígeno preparado) e os anticorpos monoclonais murinos obtidos não apresentam reação com nenhuma estrutura antigênica expressa na parede do *P. aeruginosa*, fato este que remete a especificidade provável, contra antígenos mais específicos das cepas MRSA e eventualmente MSSA (Gráfico 5).



C= complemento

**Gráfico 5** – Desempenho do teste de inibição com a incorporação dos 9 AcMm em placas de cultura com cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

A análise da cultura com cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 mostra que com todos os anticorpos ocorreu inibição de crescimento com e sem a adição da fonte de complemento. Com os anticorpos 1, 2, 4 e 5 houve total inibição de crescimento. Com os anticorpos 3, 6, 7 e 9, não ocorreu inibição total e com anticorpo 8, a inibição foi maior quando a fonte de complemento foi adicionada. (Gráfico 6)



C= complemento

**Gráfico 6** – Desempenho do teste de inibição com a incorporação dos 9 AcMm em placas de cultura com cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

Diante dos resultados descritos, entende-se de que cada um dos nove anticorpos monoclonais obtidos possa ser otimizado para uma finalidade diferente. Van Leeuwen (1999) analisa o desempenho de teste rápido para *screening* de MRSA baseado em anticorpo monoclonal fixado em partículas de látex. O autor conclui que o teste tem potencial para uso em rotinas de microbiologia por combinar rapidez e alta especificidade com nenhuma necessidade de equipamentos de alto custo e treinamento de pessoal. Dos 90 isolados de MRSA testados em paralelo com técnicas de biologia molecular, o teste rápido teve um desempenho superponível em 97% das amostras. Neste caso, nenhum isolado de MSSA foi identificado pelo teste. No entanto, o

*Staphylococcus epidermidis* metilina resistente também é identificado pelo teste.

Na tabela 4, observam-se dados referentes à cultura específica de diferentes agentes microbiológicos com a adição de cada um dos anticorpos monoclonais obtidos, na concentração de 1mg/ml de meio de cultura, em presença ou não de fonte de complemento. A adição do complemento é necessária, pois os mecanismos de ação dos anticorpos são diversos. Muitos agem por citotoxicidade dependente do complemento, outros pela citotoxicidade mediada por células. (Goulay, 2012). Foram determinadas as UFCs em comparação com a curva controle, que não recebeu nenhum anticorpo, tendo sido estabelecidas dois controles, também em triplicata. À exemplo do que foi discutido nos gráficos anteriores, fica evidente a ação dos anticorpos sobre a *E. coli*. O mecanismo de ação, tipo de proteína que reconhece, e até a possibilidade da bactéria expressar antígenos *like*, deve ser merecedor de análises mais meticolosas. (Goldwater e Bettelheim, 1995)

Observa-se que não houve inibição da *P. aeruginosa*. Em relação ao *Staphylococcus aureus* sensível a metilina, dois dos anticorpos, número 4 e 5, inibem 100% do crescimento da MSSA na presença do complemento. Estes anticorpos devem ser bem analisados para eventual uso específico podendo-se até projetar uso terapêutico dos mesmos com análise em modelo animal. Os anticorpos 5, 8 e 9 inibem 75% dos MRSA na ausência de complemento. Estes anticorpos não apresentam perfil para ensaios futuros, *in vivo*, no entanto, análises subseqüentes de concentrações maiores e estudo de desafio em camada de linfomonuclear em conjunto com a bactéria poderá validar um destes anticorpos para uso diagnóstico. O anticorpos anti-MRSA-1, e 7 apresentam o mesmo perfil de inibição das UFCs de MRSA. No teste ELISA o anticorpo 1 apresenta alta reatividade e o anticorpo 7, baixa reatividade. Ambos na concentração de 1mg/ml de meio de cultura tiveram o melhor desempenho com a inibição de 70% das UFCs na ausência de complemento, e na presença de complemento inibiram 50% das UFCs. O mecanismo de ação destes anticorpos, ainda a ser comprovado, deve ser ADCC. Enquanto que o anti-MRSA-2, também de baixa reatividade no teste ELISA, apresenta um

comportamento diferente dos anteriores, ou seja, este AcMm inibe 50% das UFCs na ausência de complemento, e quando a fonte de complemento é adicionada esta inibição passa a ser maior: 85%. Este último anticorpo deve agir pela via CDC e também pode significar perigo para estudos *in vivo*.

**Tabela 4** – Contagem das UFCs, em cultura de diferentes bactérias, em triplicata, na presença ou ausência de complemento, com a adição dos anticorpos monoclonais obtidos *versus* taxa de inibição de crescimento

AcMm Anti-	MRSA				MSSA				<i>P. aeruginosa</i>				<i>E. coli</i>			
	UFC		%		UFC		%		UFC		%		UFC		%	
	SC	C	SC	C	SC	C	SC	C	SC	C	SC	C	SC	C	SC	C
<b>MRSA-1</b>	3X 10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	70	50	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	100	100
<b>MRSA-2</b>	5 x 10 <sup>5</sup>	3 X 10 <sup>5</sup>	50	85	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	100	100
<b>MRSA-3</b>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	50	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	90	90
<b>MRSA-4</b>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	50	7 X 10 <sup>4</sup>	0	93	100	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	100	100
<b>MRSA-5</b>	2x 10 <sup>5</sup>	2 x 10 <sup>6</sup>	75	0	2 X10 <sup>5</sup>	0	75	100	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	100	100
<b>MRSA-6</b>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	50	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	90	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	90	90
<b>MRSA7</b>	3 x10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	70	50	3 X 10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	70	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	90	90
<b>MRSA-8</b>	2 x 10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	75	50	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	90	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>5</sup>	7X 10 <sup>4</sup>	90	93
<b>MRSA9</b>	2 X 10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	75	50	3 X 10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	70	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	90	90
<b>Controle</b>	10 <sup>6</sup>	2 x 10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0

■ = melhor desempenho    SC = sem complemento;

■ = desempenho médio    C = com adição do complemento

## 6. CONCLUSÕES

- 1 – Foram produzidos 9 híbridos secretores de imunoglobulinas reconhecedora do antígeno obtido a partir de isolados de MRSA.
- 2 – A produção do extrato antigênico foi possível a partir de 10 minutos de fervura a 100°C.
- 3 – Dos 1236 híbridos testados, 16 foram reagentes no primeiro testes, 61 mantiveram-se reagentes no segundo teste, 24 híbridos mantinham a positividade no terceiro *screening* e 9 híbridos demonstraram ser estáveis.
- 4 – A análise de desempenho dos 9 anticorpos obtidos frente a diferentes bactérias identificam pelo menos 2 anticorpos a serem explorados como anti-MRSA, com testes complementares futuros.
- 5 – Todos os AcMm tiveram ação inibitória sobre antígenos de *E. coli* e deverão receber análises complementares.
- 6 – Dois híbridos secretam imunoglobulina de especificidade provável anti-MSSA.

## 7. PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos, as perspectivas futuras são:

- Análise de desempenho dos anticorpos 1 e 7 com diferentes cepas tipadas por biologia molecular;
- Investigação de estruturas-*like* ao MRSA nas cepas de *E. coli* utilizadas;
- Análise de desempenho de dois anticorpos (4 e 5) com diferentes cepas tipadas de MSSA por biologia molecular
- Determinação de Classe e sub-classe das Imunoglobulinas
- Purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade;
- Fixação de diferentes concentrações de anticorpos em *biochip* contendo camada de fibroína, para análise de desempenho de teste rápido

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBER, M. Methicilin – resistant staphylococci. *J Clin Pathol.* v.14, p. 385-393, 1961.

BLANCO, M. et al. Factores de virulencia y serogrupos o de *E. coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. *Enferm. Infecc. Microbiol* v. 13, p. 236-241, 1995.

BRESSLER, A.M et al. Correlation of Penicillin Binding Protein 2 a Detection with Oxacilin Resistance in *S. aureus* and Discovery of a Novel Penicilin Binding Protein 2 a Mutation. *J Clin Microbiology.* v.43, n.9, p. 4541-4544, 2005.

CATTY,D. G.; GRAYKUNDALIA C. Immunodifusion and immunostaining In: Catty,D Atibodies : a pratical approach. *Washington IRL Press.* v.1, cap 6, p. 137-167, 1988.

CAVASSINI, M.; WENGER ,A.; JATON, K.; BLANC, D.S.; BILLE, J. Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *S. aureus*. *J Clin Microbiol*, v.37, n.5, p. 1591-4, 1999.

CHAPIN, K.C.; MUSGUNUG, M.C. Evaluation of Penicillin Binding Protein 2 a Latex Agglutination Assay for identification of M.eticillin-Resistant *S. aureus* directly from Bloods Cultures. *J. Clin Microbiology.* v.42, n. 3, p. 1283-84, 2004.

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012.

CUEVAS, O et al. Evaluation of the MRSA latex agglutination test (PBP2a) for detection of methicillin-resistant *S. aureus*, and performance against borderline oxacillin-resistant isolates. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 43rd, 2003, Chicago.

DAVID, M.Z.; DAUM, R.S. Community-Associated Methicillin-Resistant *S. aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *Clin Microbiol Rev.* v. 23, n.3, p. 616-687, 2010



DAVIS, J.N. Basic cell culture: a practical approach. *Oxford: IRL Press*. 301p.1994.

DAVIS, K.A. et al. Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) Nares Colonization at Hospital Admission and Its Effect on Subsequent MRSA Infection. *Clin Infec Dis*, v. 39, p. 776-82, 2004.

DEFFUNE, E. et al., *Manual GMP-BPL dos laboratórios de Imunohematologia – Botucatu, HC, FM, UNESP, 2ª versão*, p.134, 1996.

DEFFUNE, E. *Obtention d'anticorps monoclonaux murins dirigés contre le troisième composant du complément*. Interet in immunohematologie. Paris, 1992. Doctoral Thesis – Interet in immunohematologie. Université Pierre et Marie Curie – VI.

DIAB M; EI-DAMARAWY, M.; SHEMIS, M. Rapid identification of methicillin-resistant staphylococci bacteremia among intensive care unit patients. *Medscape J Med*.v.10, n.5, p. 126, 2008.

GOLDWATER, P.N.; BETTELHEIM, K.A. Hemolytic Uremic Syndrome due to Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O48:H21. *Emerg Inf Dis*. v.1, n.1, 1995

GORDON, J. Human Monoclonal Antibodies. In: CATTY, D. *Antibodies: a practical approach*. Washington: IRL Press, 1988. 1 (4), p.105-112

GOULAY, J.; INTRONA, M. Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays. *Arch of Biochem and Biophys*. v.526, p. 146-53, 2012.

HAMES, B.D; RICKWOOD, D. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach 3<sup>rd</sup> Edition, *The Practical Approach Series*. Oxford University Press, 1998.

HARLOW, E.; LANE, D. Eds. *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

[http://dc399.4shared.com/doc/rMZoIA\\_z/preview.html](http://dc399.4shared.com/doc/rMZoIA_z/preview.html)

<http://depts.washington.edu/hiv aids/derm/case6/discussion.html>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Methicillin.png>

<http://textbookofbacteriology.net>

[http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n9/fig\\_tab/nrmicro974\\_F1.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n9/fig_tab/nrmicro974_F1.html)

HURLEY, 2003. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant *S. aureus* Bacteremia: An Ecological Analysis. *Clin Infect Dis.* v. 37, n.6, p. 866-8, 2003.

IORIO, N.L., et al, Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* v. 45, n.8, p. 2564-9, 2007.

JAFRI, A.K.; REISNER B.S.; WOODS, G.L. Evaluation of a latex agglutination assay for rapid detection of oxacilin resistant *S. aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* v.36, n. 1, p. 57-9, 2000.

KAISER, T.D.L et al. Avaliação de métodos comumente usados em laboratórios para a determinação da suscetibilidade à oxacilina entre amostras de *Staphylococcus* sp, isoladas de um hospital de Vitória, Estado do Espírito Santo. *Rev. Soc Bras Med Trop.* v. 43, n. 3, p. 298-303, 2010.

KOHLER, G & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v.256. n.7. p. 495-497, 1975.

KONEMAN, E. W. et al. *Diagnostico microbiologico. Texto e atlas colorido.* 5. ed., Brasil, MDSI Editora Médica Científica LTDA, 2001, 1465p.

LIM, D., STRYNADKA, N.C.J. Structural basis for the  $\beta$ -lactam resistance of PBP2a from methicilin-resistant *S. aureus*. *Nat Struct Biol.* v. 9, n.11. p. 870-76, 2002.

LOPES, H.V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. *Rev Panam Infectol.* v.7,n.3, p. 34-36, 2005.

MIMICA, M. J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial da resistência a oxacilina em *S. aureus*. *J Bras Patol Med Lab.* v.43, n.6, p. 399-406, 2007.

MOHANASOUNDARAM, K.M.; LALITHA, M.K. Comparison of phenotypic versus genotypic methods in the detection of methicillin resistance in *S. aureus*. *Indian J Med Res.* v.127, n.1, p. 78-84, 2008.

MOREIRA, M.; MEDEIROS, E.A.S. ; PIGNATARI, A.C.C ; WEY, S.B.; CARDO, D.M. Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *S. aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização *Rev Ass Med Brasil* . v.44, n.4, p. 263-8, 1998.

RENUKARADHYA, J.G.; SHIRAM, V.; POLAKOVA, K.; BRUTKIEWICZ, R.R.. Development of a quantitative cell-based intracellular ELISA for the screening of B cell hybridoma supernatants: A novel rapid assay to detect positive clones. *Hybrid Hybridomies.* v. 23, p.373 – 9, 2004.

ROSSI, F.; ANDREZZI, D. *Interpretando o Antibiograma*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 118p.

SILVA, P. Hospital infection in the context of the health policies established by the state of Santa Catarina. *Rev Lat Am Enf.* v. 11, n.1, p. 108-114, 2003.

SOUZA, M.V. et al. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos. *Rev Patol Trop.* v.34, n.1, p. 27-36, 2005.

STAPLETON, P.D.; TAYLOR, P.W. Methicillin resistance in *S. aureus*. *Sci Prog* . v.85, n.1, p. 57-72, 2002.

TRABULSI, L.R. et al. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, 718p.

ULLOA, T.M. et al. Comparación de reacción de polimerasa en cadena, látex y antibiograma para detección de *S. aureus* meticilina resistente. *Rev. Chil Infectol (online)*. v.18, n. 11, p. 255-260 , 2001.

VAN HAAL, S.J. et al. Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) Detection: Comparison of Two Molecular Methods (IDI-MRSA PCR Assay and GenoType MRSA Direct PCR Assay) with Three Selective MRSA Agars (MRSA ID, MRSA Select, and CHROMagar MRSA) for Use with Infection-Control Swabs. *J Clin Microbiology*, v. 45, n.8, p. 2486-2490, 2007.

VAN LEEUWEN, W.B. et al. Rapid detection of Methicilin Resistance in *S. aureus* Isolates by the MRSA-Screen Latex Agglutination Test. *J Clin Microbiology*. v.37, n.9. p. 3029-30, 1999.

Vicentini-Oliveira, J.C. et al.,. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. *Exp Paras*, v. 126, issue 4, p.621-625. dez, 2010

ZURITA , J.; MEJIA,C.; GUZMÁN-BLANCO,M . Diagnóstico e teste de sensibilidade para *S. aureus* resistente à metilina na América Latina . *Braz J Infect Dis*, v. 14 , supl 2, p. S97-107, 2010.





**unesp**

# Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 976-2012) "Produção e caracterização de Anticorpo monoclonal murino dirigido contra a Psp2a do *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina", está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "camundongos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.



Prof<sup>ma</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Rosa Bet Moraes Silva  
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capellupi  
Secretário da CEEA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 25/10/2012.

Distrito Rubião Junior, s/nº - Bauracru - S.P. CEP: 16.818-670 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6149 e-mail:escritoria\_cep@unesp.br