

REA.11 - Seleção e caracterização de aptâmeros contra proteína PBP2a para o diagnóstico de infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Láís Nascimento Alves^{1*}; Sotiris Missailidis²; José Procópio Moreno Senna²; Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida¹.

¹Instituto de Radioproteção e Dosimetria;

²Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais frequentes que existem, tanto dentro dos hospitais como na sociedade, sendo uma das principais causadoras de infecções hospitalares. A meticilina, um antibiótico β -lactâmico que pertence ao grupo das penicilinas, tem sido muito utilizada no tratamento de pacientes infectados por este microorganismo. Este tipo de antibiótico atua, de forma geral, inibindo as proteínas que se ligam à penicilina (PBP) presentes na membrana destas bactérias. No entanto, a *S. aureus* pode se tornar resistente à meticilina (MRSA) e a outros β -lactâmicos, através do aumento da expressão de uma isoforma das PBP não sensível a este medicamento, a PBP2a. Devido às opções limitadas de tratamento, o diagnóstico acurado e precoce faz-se extremamente importante para determinar o melhor curso terapêutico antes do avanço grave da infecção. O diagnóstico dessas infecções é baseado atualmente na análise *in vitro* de amostras, o que não oferece uma identificação clara da situação geral do paciente. Aptâmeros são ferramentas moleculares sofisticadas selecionadas *in vitro* com capacidade de ligarem-se com grande afinidade e especificidade a alvos, sendo assim, uma opção viável para o estudo de nova proposta de diagnóstico da infecção por MRSA.

Objetivo:

Seleção e caracterização de aptâmeros anti-PBP2a para radioimunodiagnóstico *in situ* de infecções por MRSA.

Metodologia:

Usando a metodologia SELEX, conforme protocolo descrito por Simmons *et al* (2012), 100 μ L de biblioteca de aptâmeros em cadeia simples amplificados foram incubados no poço com fragmento da proteína PBP2a adsorvido em

placa de ELISA, durante 1 h com agitação. Os aptâmeros desacoplados e espécies ligadas com baixa afinidade foram removidos por incubação de 100 μ L de PBS com 0.5 M de NaCl, num agitador durante 5 minutos. Os aptâmeros que permaneceram ligados foram eluídos usando um gradiente de NaCl que variou de 1.0 M a 1.5 M, em incrementos de 100 mM coletados separadamente, e uma eluição final de 3.0 M NaSCN. Os materiais coletados foram dessalinizados utilizando-se filtros Microcons (Millipore, Life Sciences) com um peso molecular limite de 5 kDa, e, em seguida, amplificados com PCR cadeia dupla para visualização em gel de agarose para verificar a presença dos aptâmeros.

Resultado:

Foram identificados aptâmeros em todas as bandas de interesse. Como eram esperados de apresentar a maior afinidade e especificidade para a PBP2a, as amostras das eluições 1.5M NaCl e 3.0M NaSCN foram utilizadas para clonagem em *E.coli* Top10 usando vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). Após sequenciamento, três sequências dominantes foram identificadas e analisadas por MFold para a predição das suas estruturas secundárias. Por fim, os aptâmeros foram avaliados por espectroscopia de fluorescência para estabelecer lista de candidatos para desenvolvimento, baseado na constante de Stern-Volmer para determinação de afinidade.

Conclusão:

Os aptâmeros foram identificados com sucesso.

Palavras-chave: aptâmeros anti-PBP2a; MRSA; diagnóstico *in situ*