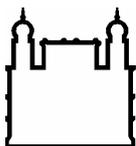


**INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-PBP2a EM PACIENTES  
COLONIZADOS POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A  
METICILINA (MRSA)**

**RODRIGO MÜLLER**

RIO DE JANEIRO  
2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**RODRIGO MÜLLER**

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-PBP2a EM PACIENTES  
COLONIZADOS POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A  
METICILINA (MRSA)**

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  
2009

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

M958

Müller, Rodrigo

Pesquisa de anticorpos anti-PBP2a em pacientes colonizados  
por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

Rodrigo Müller - Rio de Janeiro, 2009.

xiv, 72 f.: il. ; 30 cm.

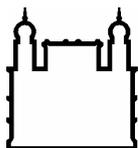
Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Mestrado  
Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos, 2009.

Bibliografia: f. 57-67

1. *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). 2.  
anticorpos anti-PBP2a. 3. Colonização. 4. Vacina. I.Título.

CDD 616 014

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, na Vice Diretoria de Desenvolvimento no Laboratório de Tecnologia Recombinante (Later), sob a orientação do Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS  
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS**

**RODRIGO MÜLLER**

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-PBP2a EM PACIENTES  
COLONIZADOS POR *Staphylococcus aureus* RESISTENTES A  
METICILINA (MRSA)**

**Orientador: Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna**

**Dissertação aprovada em 15/06/2009**

**Examinadores:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rugimar Marcovistz**

**Bio-Manguinhos/ Fiocruz / Presidente**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Agnes Marie Sa Figueiredo**

**UFRJ**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dália dos Prazeres Rodrigues**

**IOC/Fiocruz**

**RIO DE JANEIRO**

**2009**

Dedicada, com afeto,

Ao meu pai, e a meus avós Dora e Orestes  
(*in memoriam*) por tudo que me proporcionaram,  
pelos ensinamentos e pelo amor incondicional,  
dando sentido à minha vida.

Aos meus irmãos Marcelo, Leandro e Bruno,  
sempre tão queridos e presentes em minha vida.

À minha mãe que apesar de distante sempre  
me apoiou e colocou-me à frente.

Aos meus queridos enteados Pedro e Manuela  
que crescem superando todas as minhas  
expectativas.

À minha mulher Patrícia, pela amizade,  
pelo carinho, pela compreensão, enfim,  
por tudo e por tanto, o amor da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna, pelo carinho e incentivo, apontando no momento certo o rumo desta dissertação, como também pelos ensinamentos.

Ao amigo Pedro Fernandez Del Peloso por todo suporte e coleção das amostras cedidas.

Aos meus amigos incondicionais Leandro Aquino e Leandro Ramos pelos momentos de tranquilidade que me propiciaram ao longo da realização desta dissertação.

Aos meus queridos colegas e funcionários do Laboratório de Experimentação Animal de Bio-Manguinhos / FIOCRUZ, pelo carinho e incentivo.

À minha amiga e chefe Fernanda Rimolli que me incentivou e me proporcionou as oportunidades necessárias para que eu pudesse realizar esta dissertação.

Aos colegas Luiz Cesar Cavalcanti, Alessandra Matias e Isabel Freire pelo carinho e apoio nas minhas ausências.

À colega Natália Plínio de Souza por tudo que me proporcionou de conhecimento nas técnicas de bancada e pela imensa cooperação nesta dissertação.

À Dra. Rugimar Marcovitz pela revisão desta dissertação com empenho e carinho.

À Dra. Dália dos Prazeres pelo enriquecimento deste trabalho em minha banca de qualificação.

Aos Professores, Coordenadores e secretária do Curso de Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos pela dedicação, competência e interação com a turma.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) pelo apoio e espaço cedido para realização deste trabalho.

Ao Dr. Akira Homma, diretor de Bio-Manguinhos, e aos meus colegas de turma pelos momentos de alegria e descontração.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. As Bactérias do Gênero <i>Staphylococcus</i> – Características Gerais.....	2
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metilina.....	4
1.2.1. Histórico.....	4
1.2.2. MRSA e a resistência a Vancomicina (VISA / VRSA/ VSSA).....	5
1.2.3. Mecanismo de ação dos beta-lactâmicos.....	7
1.2.4. Mecanismo de resistência à Metilina.....	7
1.2.4.1. A PBP2a – estrutura, domínios, centro Ativo.....	8
1.2.4.2. Classificação da PBP2a.....	10
1.2.4.3. Identificação laboratorial de MRSA (CLSI).....	10
1.3. <i>Staphylococcus</i> sp. e a expressão de fatores de colonização e virulência.....	11
1.3.1. Fases do crescimento bacteriano expressão de fatores de colonização e virulência.....	11
1.3.2. Regulação da expressão dos fatores de colonização e virulência - sistema quorum sensing e Agr (gene regulador acessório).....	13
1.3.3. MSCRAMMs.....	14
1.4. Epidemiologia de MRSA.....	15
1.4.1. Infecções hospitalares.....	16
1.4.2. Infecções comunitárias por MRSA.....	17
1.4.3. Prevalência de MRSA.....	17
1.4.4. Colonização nasal.....	22
1.5. <i>Staphylococcus aureus</i> e o sistema imune – Resposta inata e adaptativa.....	25
1.5.1. Evasão imune por <i>Staphylococcus</i> .....	26
1.6. Imunoterapias anti-estafilococos e MRSA.....	29
1.6.1. Vacinas anti <i>S.aureus</i> .....	30
1.6.1.1. Staph Vax.....	30
1.6.1.2. Vacina anti- <i>Clumping factor (Clf B)</i> .....	30
1.6.1.3. Vacina proteínas de superfície.....	31
1.6.2. Vacinas anti-MRSA.....	31
1.6.2.1. Vacina de DNA anti- <i>mecA</i> .....	31
1.6.2.2. Vacina DNA anti-fragmento da PBP2a.....	31
1.6.2.3. Vacina de mucosa com vetor auxotrófico anti-PBP2a para promover a descolonização nasal por MRSA.....	32
1.6.3. Terapia com anticorpos monoclonais anti- <i>Staphylococcus</i> .....	33
1.7. Objetivos do trabalho.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35

2.1. Amostras.....	35
2.2. Identificação de anticorpos anti-PBP2a.....	36
2.2.1. Teste de ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ).....	36
2.2.2. Western blot.....	36
2.2.2.1 Western blot contra a PBP2a purificada.....	37
2.2.2.2 Western blot contra proteínas de superfície de MRSA.....	38
2.3. Extração de imunoglobulinas dos soros dos pacientes.....	38
2.4. Ensaio de proteção <i>in vitro</i> .....	39
2.4.1. Ensaio em placa.....	39
2.4.2. Ensaio cinético de proteção <i>in vitro</i> .....	40
2.5. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Antibiograma).....	40
3. RESULTADOS.....	41
3.1. Características da amostras.....	41
3.2. Imunoensaios.....	46
3.2.1 ELISA.....	46
3.2.2. Western Blot.....	47
3.2.2.1. Western blot anticorpos anti PBP2a.....	47
3.2.2.2. Western blot - proteínas de superfície de MRSA.....	47
3.3. Extração e purificação das Imunoglobulinas.....	49
3.4. Ensaio de proteção <i>in vitro</i> .....	50
3.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima em placa.....	50
3.4.2. Cinética de crescimento de MRSA em presença de imunoglobulinas purificadas do soro de pacientes colonizados por MRSA.....	51
3.4.3. Curva de crescimento de MRSA em presença de imunoglobulinas purificadas do soro de pacientes colonizados por MRSA (quantificação bacteriana).....	52
3.5. Teste de sensibilidade a antibióticos das amostras analisadas.....	53
4. DISCUSSÃO.....	55
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
7. ANEXOS.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
Agr	Gene regulador acessório
BSA	albumina bovina sérica
CA-MRSA	Cepas de MRSA adquiridas na comunidade
CEB	Clone epidêmico brasileiro
Cut-off	Valor de corte
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme linked immunosorbent assay)
ESBLs	enterobactérias portadoras de beta-lactamases de largo espectro
HCL	Ácido clorídrico
HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IgG	Imunoglobulina G
IH	Infecções hospitalares
IL	Interleucina
kDa	Kilodalton
lag	Latência
log	logaritmo
mL	Mililitro
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à Meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensíveis à Meticilina
MSCRAMMs	<i>Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
rpm	rotações por minutos
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SENIC	<i>Study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TSST-1	Síndrome do choque tóxico - toxina 1
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência à vancomicina
VSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à vancomicina

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais eventos em <i>S. aureus</i> .....	5
Tabela 2: Tempo necessário para taxas de resistência do <i>Staphylococcus aureus</i> à penicilina, vancomicina e meticilina atingirem 25% nos hospitais e na comunidade.....	17
Tabela 3 – Distribuição de sexo, faixa etária, motivo de internamento, procedência e unidade de internamento dos 231 pacientes segundo colonização por <i>S. aureus</i> importado para as UTIs – Hospital Universitário Oswaldo Cruz – Pernambuco - Brasil – Jan/Abr 2003.....	21
Tabela 4: Constituintes da parede celular do <i>S. aureus</i> que contribuem para a indução da resposta imunológica no hospedeiro.....	27
Tabela 5: Enzimas e toxinas produzidas pelo <i>S. aureus</i> que participam dos mecanismos de patogenicidade e de resistência a esse patógeno.....	28
Tabela 6: Dados gerais e resultados sorológicos dos pacientes.....	43
Tabela 7: Resultados da contagem e quantificação bacteriana x poços.....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia (A) e característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao gênero <i>Staphylococcus</i> spp.....	3
Figura 2: Representação esquemática da região codificada por <i>mecA-mecR-mecI</i> .....	8
Figura 3. Estrutura da PBP2a.....	9
Figura 4. Relação entre curva de crescimento e expressão dos fatores de virulência em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
Figura 5. Princípio de funcionamento do <i>quorum sensing</i> .....	13
Figura 6: Organização estrutural de proteínas MSCRAMMs.....	14
Figura. 7. Representação da parede celular - proteínas de superfície em bactérias gram-positivas.....	15
Figura 8: Número de publicações PubMed, 2000 a outubro de 2006: CA-MRSA.....	18
Figura 9: Percentagem de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina isolados de 1999 a 2002 na Europa.....	19
Figura 10: Taxa de adultos portadores de <i>S. aureus</i> .....	23
Figura 11: Amostras referentes ao teste de ELISA.....	46
Figura 12: Representação de amostras positivas e negativas no ensaio de Western blot para detecção de anticorpos anti-PBP2a em soro de pacientes colonizados por MRSA.....	47
Figura 13: Western blot de soro de pacientes x proteínas de superfície de lisado de MRSA....	48
Figura 14: Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) com amostras do soro de pacientes antes e após purificação de imunoglobulinas pelo sistema Ab SpinTRap (GE).....	49
Figura 15: Representação dos resultados de inibição do crescimento bacteriano <i>in vitro</i> .....	50
Figura 16: Cinética de crescimento de MRSA x IGs soros de pacientes colonizados.....	51
Figura 17: Curva de crescimento bacteriano x tempo.....	52
Figura 18: Resistência microbiana das amostras analisadas.....	54

## RESUMO

As infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são temidas em virtude da dificuldade de seu tratamento e da elevada morbidade associada. A PBP2a (penicillin binding protein 2a), enzima responsável pela síntese da parede celular em MRSA, apresenta baixíssima afinidade por beta-lactâmicos. Pelo fato de a PBP2a estar localizada na superfície externa, a mesma seria acessível ao sistema imune. Durante as infecções causadas por MRSA, pouco se sabe se o hospedeiro infectado ou colonizado desenvolve anticorpos anti-PBP2a e se os mesmos seriam protetores ou não. O presente projeto tem por finalidade avaliar a presença e níveis de anticorpos anti-PBP2a em um grupo de 56 pacientes colonizados por MRSA e investigar se estes anticorpos seriam protetores ou não. Os resultados gerados permitiram observar que 71% das amostras analisadas apresentaram anticorpos anti-PBP2a pelo teste ELISA. Estas amostras foram submetidas à Western blot para confirmação, demonstrando que 46% das amostras possuíam anticorpos anti-PBP2a. Após estes resultados, as amostras positivas foram submetidas à purificação para avaliar a cinética de crescimento de MRSA. Foi observado que houve ligeira redução do crescimento bacteriano entre amostras de soro com anticorpos MRSA comparadas com as de soro com anticorpos anti-MSSA (PBP2a negativos). Por conseguinte avaliamos a curva de crescimento de MRSA em presença de imunoglobulinas purificadas de soro de pacientes colonizados por MRSA, (quantificação bacteriana). Observamos que houve uma redução drástica do crescimento bacteriano em presença destas imunoglobulinas. Os resultados obtidos indicaram que: (i) pacientes colonizados por MRSA podem produzir anticorpos anti-PBP2a e (ii) estes anticorpos podem conferir proteção contra MRSA. Estes dados parecem indicar que uma potencial vacina anti-PBP2a poderia ser efetiva para prevenção de infecções causadas por MRSA, como também para o emprego de imunoterapia passiva para o tratamento de pacientes infectados por este patógeno.

## ABSTRACT

Infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are feared because of the difficulty of their treatment and the high associated morbidity. The PBP2a (penicillin binding protein 2a), the enzyme responsible for cell wall synthesis in MRSA, presents low affinity for beta-lactams. Because of the PBP2a is located on the external surface, it would be accessible to the immune system. During the MRSA infections, little is known whether the infected or colonized host can produce antibodies anti-PBP2a and whether these antibodies would be protective or not. This project aims to assess the presence and levels of anti-PBP2a in a group of 56 patients colonized by MRSA and investigate whether these antibodies would be protective or not. The results showed that 71% of the samples presented anti-PBP2a antibodies in ELISA. These samples which were subjected to Western blot for confirmation, it was demonstrated that 46% of the samples presented antibodies anti-PBP2a. After these results, the positive samples were subjected to purification to assess the MRSA growth kinetics. It was observed that there was a slight reduction in bacterial growth between serum samples with antibodies and MRSA compared to those of the serum with anti-MSSA (PBP2a negative). Therefore, the curve of growth of MRSA was evaluated in the presence of purified immunoglobulins from the serum of patients colonized by MRSA (bacterial quantification). We observed that there was a drastic reduction in bacterial growth in the presence of immunoglobulins, thus demonstrating that these antibodies could have a protective action. These results indicated that: (i) MRSA colonized patients can produce antibodies against PBP2a and (ii) these antibodies can be protective against MRSA. These data suggest that a potential vaccine anti-PBP2a could be effective for prevention of infections caused by MRSA and for the use of passive immunotherapy in the treatment of patients infected by this pathogen.

## 1. INTRODUÇÃO

Devemos temer o surgimento de uma pandemia planetária, contra a qual não existem antimicrobianos capazes de controlar este quadro ?

Por um período extremamente curto - cerca de meio século de existência, os antibióticos possuíram um período de efetividade extraordinário. Considerados na época, a solução definitiva contra as doenças infecciosas bacterianas, centenas de milhares de toneladas de antibióticos foram produzidas e liberadas para o meio ambiente, ou ingeridas pelo homem e pelos animais. Após este período inicial de descobertas médicas e de euforia pela eficiência desta estratégia terapêutica, sua ampla utilização é atualmente questionada, ao menos de duas maneiras: Pelo desenvolvimento de resistências bacterianas e pela escassez da descoberta de novos antibióticos pela indústria farmacêutica (Andremont, 2007).

Esta espécie de resposta das bactérias tem sido causada principalmente pelo uso indiscriminado dos antimicrobianos – em especial fármacos de largo espectro de ação – não só no tratamento clínico das doenças infecciosas, mas também na adição de antimicrobianos aos alimentos que ingerimos cotidianamente.

A **pressão de seleção**, levou ao surgimento de patógenos causadores de infecções de difícil tratamento, como os *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, as enterobactérias portadoras de beta-lactamases de largo espectro (ESBLs), os enterococos portadores de genes de resistência à vancomicina e os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, também conhecidos com **MRSA** (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) – objeto de nosso estudo.

Com uma surpreendente capacidade de adaptação ao meio ambiente, em especial a pressão de seleção exercida pelos antimicrobianos, *S. aureus* desenvolveu uma resistência crescente, desde a introdução da penicilina na terapia médica em 1942 até os fármacos mais recentes, como o Synercid (Drago, 2008), por exemplo.

Os MRSA são, em sua grande maioria, sensíveis somente aos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina). Entretanto, a identificação de cepas resistentes à vancomicina – VRSA, isoladas em 2002 (Weigel, 2003) nos leva a crer sobre a possibilidade de retornarmos a era pré-antibiótica como real.

Desta forma, a busca por novas alternativas de tratamento das infecções bacterianas é de suma importância e o conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese bacteriana pode nos fornecer pistas importantes para o desenvolvimento de novas formas de tratamento.

Uma grande parcela da população apresenta-se colonizada por estafilococos com cerca de 20% considerados portadores permanentes e 60% transitórios (Peacock, 2001). Este fato possui duas consequências: A primeira delas seria o risco destes portadores desenvolverem infecções causadas por estas bactérias (infecções endógenas) e a segunda seria o risco destes portadores - em especial os agentes de saúde - disseminarem estas bactérias (MRSA particularmente) entre pacientes hospitalizados, como demonstrado por (Senna *et. al.*, 2003), onde em uma triagem entre agentes de saúde de um hospital foram encontrados 3% de portadores de cepas MRSA.

Por outro lado, pouco se sabe se a colonização por *S. aureus* (ou MRSA) seria capaz de estimular o sistema imunológico a produzir anticorpos, e se estes anticorpos teriam ação protetora contra este patógeno. Estas hipóteses, difíceis de serem abordadas em razão da dificuldade de se medir fatores relacionados com a intensidade e duração da exposição ao patógeno, estado imunológico do paciente colonizado entre outros, foram investigadas no presente trabalho, tendo como modelo a **PBP2a** (*penicillin binding protein 2a*) – uma transpeptidase de baixíssima afinidade pelos beta-lactâmicos, que proporciona resistência cruzada a todos os antimicrobianos pertencentes a esta classe.

### **1.1. As Bactérias do Gênero *Staphylococcus* – Características Gerais**

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – 2008 a classificação taxonômica de *Staphylococcus aureus* segue a seguinte sequência: Filo: Firmicutes, Classe: *Bacilli*, Ordem: *Bacillales*, Família: *Staphylococcaceae*, Gênero: *Staphylococcus*, Espécie: *S. aureus*.

A primeira descrição de bactérias do gênero *Staphylococcus* (do grego “*staphyle*” = cacho de uvas, e “*cocos*” = grão) foi realizada por Ogston em 1880, que relatou *coccus* em formato de cacho de uva, como a causa de um grande número de doenças piogênicas (Baird-Parker, 1990).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos encontrados como organismos comensais ou patógenos bacterianos tanto para humanos como animais. São imóveis, com diâmetro variando entre 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , não formadoras de esporos podendo aparecer de forma isolada, em pares, cadeias curtas ou em cachos (Figura 1A-B). São formadoras de colônias pigmentadas, em geral não-capsuladas, catalase e termonuclease positivas e coagulase positivas ou negativas (Ravel, 1997; Zecconi; Hahn, 2000). Em meio de Agar Sangue, alguns isolados produzem  $\beta$ -hemólise (Koneman *et al.*, 2001).

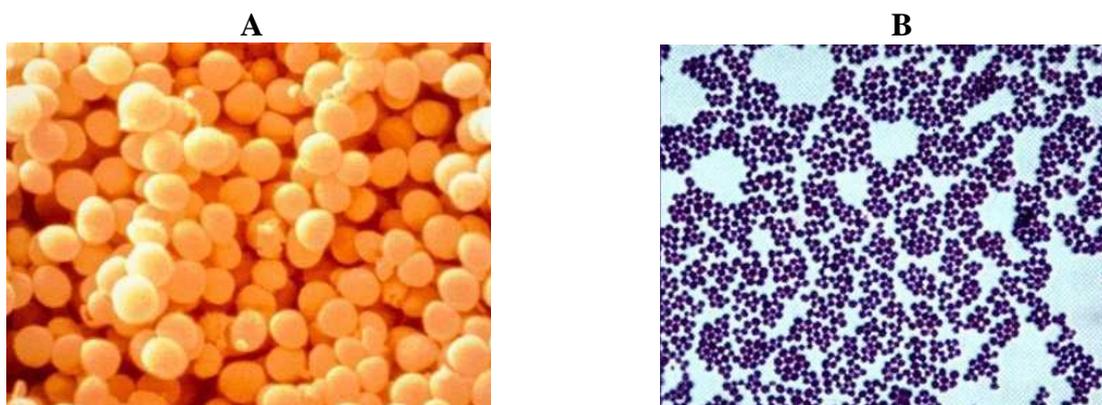


Figura 1: Morfologia (A) e característica morfotintorial pela técnica de coloração de Gram (B) de microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. Fonte: Science Photo Library (2009).

Somente as espécies *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi coagulans* e alguns isolados de *Staphylococcus hyicus* são coagulase positivos. A maioria das espécies de *Staphylococcus* é coagulase negativa (Holt *et al.*, 1994).

Os seres humanos são comumente colonizados por *S. aureus* em superfícies externas da pele e trato respiratório superior, particularmente nas fossas nasais. Indivíduos saudáveis normalmente carregam o *Staphylococcus aureus*, mas eles podem sofrer infecções cutâneas limitadas e localizadas (leves), tais como furúnculos e abscessos. No entanto, *S. aureus* é um patógeno oportunista, e dadas às circunstâncias podem causar infecções mais graves. Queimaduras e feridas cirúrgicas são infecções

comumente causadas por *S. aureus*, onde a produção de certas toxinas pode, por exemplo, originar a síndrome de choque tóxico, doença grave que pode levar a morte por falência múltipla dos órgãos. Infecções causadas pelo *S. aureus* incluem, pneumonia, mastite, infecções de pele (impetigo, celulite e furunculoses), osteomielite, endocardite e bacteremia. *S. aureus* pode também causar intoxicação alimentar, como resultado da produção enterotoxina (Stapleton & Taylor, 2002). A elevada virulência de *S. aureus* foi relatada pela primeira vez depois de um estudo publicado em 1941, que identificou 82% de mortalidade associada a pacientes com bacteremias causadas por este microrganismo, em um hospital na cidade de Boston (Velásquez-Meza, 2005).

## **1.2. *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA)**

### **1.2.1. Histórico**

Ao descobrir a penicilina em 1929, Fleming foi o primeiro observador da resistência natural de microrganismos aos antibióticos, descrevendo que bactérias do grupo coli-tifóide e a *Pseudomonas aeruginosa* (*Bacillus pyocyaneus*) não eram inibidas pelo antibiótico. A causa desta resistência natural foi, pouco depois, descoberta por Abraham e Chain, que, em 1940, um ano antes da primeira publicação sobre o uso clínico da penicilina, demonstraram em extratos de *Escherichia coli* (*E. coli*) uma enzima capaz de destruir a ação da penicilina, a qual denominaram penicilinase. A difusão do uso clínico da penicilina trouxe o conhecimento do fato de que entre microrganismos sensíveis ao antibiótico ocorriam exemplares resistentes. Foi verificado por Kirby, em 1944, que alguns *Staphylococcus aureus* isolados de material clínico mostravam-se resistentes à penicilina devido à produção de penicilinase. Em 1946, nos Estados Unidos, cerca de 5% dos estafilococos isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à penicilina. Em 1949 esta resistência podia ser notada em 29% dos germes isolados em hospitais norte-americanos; em 1950 atingia 50% e em 1959 era de cerca de 80%. No Brasil, atualmente, acima de 80% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados e cerca de 70% dos isolados de pacientes da comunidade apresentam resistência às penicilinas naturais e, por extensão, à ampicilina e amoxicilina (Tavares, 2000).

Os *Staphylococcus aureus* sempre representaram um desafio em relação ao desenvolvimento de novos antimicrobianos e desenvolveram resistência a todos os agentes terapêuticos que foram desenvolvidos nos últimos 50 anos (Hiramatsu *et al.*, 2001), a exceção de novas drogas anti-MRSA. O mais notável exemplo desse fenômeno ocorreu em 1961, onde se relatou o primeiro isolamento clínico de *S.aureus* resistente ao Celbenin (Meticilina) no Reino Unido, e tal resistência foi encontrada aproximadamente um ano após o lançamento da meticilina (Jevons, 1961) e em outros países europeus e mais tarde no Japão, Austrália e Estados Unidos.

Desde então, o MRSA foi cada vez mais notificado, e na década de 1970 começou a causar graves infecções hospitalares em todo o mundo. (Hiramatsu *et al.*, 2001). Na Tabela 1 estão citados os principais eventos envolvendo *S. aureus*.

Tabela 1: Principais eventos em *S. aureus* (Heiman *et al.*, 2005)

Ano	Evento
1880	Alexander Ogston indentificou <i>Micrococcus</i> em uma infecção purulenta.
1931	A associação entre colonização nasal e furunculose foi descoberta.
1934	Popularização da identificação do <i>S.aureus</i> pelo teste de coagulase.
1944	Introdução da fogotipagem.
1947	Reportada resistência do <i>S.aureus</i> à penicilina.
1952	Associação entre colonização nasal e infecção pela mesma cepa.
1961	Reportada resistência do <i>S.aureus</i> à Meticilina
1991	Eletroforese em campo pulsado foi utilizada para genotipagem do <i>S.aureus</i> .
1994	Identificação dos MSCRAMMs.
2000	<i>Multilocus sequencing typing</i> foi desenvolvido para estudar a clonalidade da <i>S.aureus</i> .
2001	Descoberto genoma do <i>S.aureus</i> .
2001	80% dos <i>S.aureus</i> isolados de bacteremias são de origem endógena.
2001	Aumento da infecção comunitária por MRSA
2002	Reportada resistência a vancomicina

### 1.2.2. MRSA e a resistência a Vancomicina (VISA / VRSA/ VSSA)

Como a vancomicina é o antimicrobiano de primeira escolha para o tratamento de infecções por MRSA, o monitoramento de resistência a este fármaco necessita ser realizado. O surgimento de cepas *Staphylococcus* coagulase negativa, resistentes a vancomicina, foi o primeiro indicativo de que esta bactéria estaria realizando mais um passo na escala de resistência aos antibióticos, provavelmente em decorrência de seu uso abusivo na terapia médica (Santos *et al.*, 2007).

Ainda não existe consenso sobre a terminologia para estafilococos com reduzida suscetibilidade à vancomicina, já que os termos VRSA, h-VRSA, VISA e GISA têm sido utilizados, muitas vezes, para descrever amostras de *S. aureus* com as mesmas características. O termo VRSA, ou *S. aureus* resistente à vancomicina, sugere a falha da vancomicina em erradicar a infecção pelo *S. aureus* quando administrada em doses clínicas apropriadas. Nos EUA, este termo é reservado aos *S. aureus* cujo MIC (crescimento inibitório mínimo) da vancomicina é  $\geq 32$  mg/L, mas em outros lugares do mundo, como no Japão, é empregado aos *S. aureus* cujo MIC da vancomicina é  $\geq 8$  mg/L (Tenover, 1999). Segundo a descrição de Chang (2003), pacientes infectados com *S. aureus* resistente à vancomicina contém o gene de resistência *vanA* de resistência à vancomicina, primeiramente identificados em *Enterococcus*.

O “Center for Disease Control and Prevention” (CDC) estabeleceu como sensível (VSSA), intermediário (VISA), e resistente (VRSA) aqueles estafilococos cujo crescimento é inibido por concentrações de vancomicina  $\leq 4$  mg/L, 8 a 16 mg/L, e  $\geq 32$  mg/L, respectivamente ([http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_visavrsa\\_FAQ.html#2](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_visavrsa_FAQ.html#2) em 21/012009). Os termos VISA, ou *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina, e GISA, ou *S. aureus* com resistência intermediária aos glicopeptídeos, foram derivados deste critério. O termo GISA parece mais acurado uma vez que a maioria dos casos já relatados eram intermediariamente resistentes tanto à vancomicina como à teicoplanina; porém, o termo VISA é mais comumente utilizado (Tenover, 1999).

Segundo Rodríguez & Vesga (2005), o mecanismo de resistência para VISA está diretamente ligado ao espessamento da parede do peptidoglicano.

Na França, o “Comité de l’Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie” publicou “breakpoints” similares aos estabelecidos pelo NCCLS. Contudo, usando os critérios interpretativos da “British Society for Antimicrobial 25 Chemotherapy”, *S. aureus* inibidos por concentrações inibitórias mínimas (MIC) da vancomicina  $\leq 4$  mg/L são considerados sensíveis (VSSA) e por MIC  $\geq 8$  mg/L da vancomicina são descritos como resistentes à vancomicina (VRSA) (Tenover *et al.*, 2001).

Além disso, a expressão “heteroresistant VRSA” (h-VRSA) tem sido usada para determinar *S. aureus* que contém uma subpopulação capaz de crescer em placas de agar contendo 4 mg/L de vancomicina em 48 horas, e que o MIC da vancomicina para esta subpopulação seja, pelo menos, 8 mg/L (Hiramatsu *et al.*, 1997). Outros autores

consideram h-VRSA aqueles *S. aureus* que apresentam um MIC da vancomicina  $\geq 8$  mg/L através do método do E-test utilizando um meio nutricionalmente rico (BHI) e um inóculo bacteriano concentrado (Bobin-Dubreux *et al.*, 2001; Walsh, 2001; Wootton, 2001).

### 1.2.3. Mecanismo de Ação dos beta-lactâmicos

Os  $\beta$ -lactâmicos normalmente ligam-se às PBPs localizadas na parede celular, resultando na interrupção da síntese do peptidoglicano e morte da bactéria. Quando os  $\beta$ -lactâmicos não conseguem fazer a ligação à PBP2a, a síntese do peptidoglicano da parede celular pode ser continuada (Deurenberg *et al.*, 2006).

### 1.2.4. Mecanismo de Resistência à Meticilina

A resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus* é determinada, na grande maioria das vezes, pela presença de um gene localizado no cromossomo, o gene *mecA*. Este gene é responsável pela síntese da proteína ligadora de penicilina 2a, ou 2' (PBP2a ou PBP2'), que substitui as outras proteínas ligadoras de penicilina na membrana na presença do antibiótico  $\beta$ -lactâmico e possui baixa afinidade não só para a oxacilina como para os outros antimicrobianos beta-lactâmicos. A síntese da parede celular do peptidoglicano é capaz de continuar sendo feita em cepas MRSA com a atividade de transpeptidase da PBP2a, uma vez que as demais PBPs estão bloqueadas pelo antibiótico.

O gene *mecA* é regulado pelo repressor *mecI* e da tradução do sinal de *mecRI*, localizado na transmembrana da bactéria, os quais são divergentemente transcritos. No entanto, na ausência do antibiótico  $\beta$ -lactâmico, *mecI* reprime a transcrição de ambos; *mecA* e *mecRI-mecI*. Na presença do  $\beta$ -lactâmico, a proteína *Mec I* clivada pelo domínio metalo-protease, localizado na parte citoplasmática de *MecRI*, e torna-se ativa. As metalo-proteases clivam *mecI* localizada na região ativa de *mecA*, o que permite transcrição de *mecA* e subsequente produção de PBP2a (Deurenberg *et al.*, 2006). Uma representação do sistema *mecA*, *mecR*, *mecI*, encontra-se na Figura 2.

O gene *mecA* faz parte de uma ilha genômica de resistência chamada staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*), podendo essas ilhas conter também outros genes de resistência a outros antimicrobianos. Enquanto os HA-MRSA

(hospital-acquired MRSA) carregam SCC<sub>mec</sub> dos tipos I a III, os CA-MRSA (community-acquired MRSA) estão mais associados aos tipos IV e V. Os tipos IV e V são elementos genéticos menores e com mais mobilidade que os outros. Esses tipos carregam menos genes determinantes de resistência do que os tipos II e III. Por isso, os CA-MRSA caracteristicamente tendem a ser menos multirresistentes que os HA-MRSA, mantendo em geral sensibilidade à clindamicina, por exemplo (Mímica & Mendes, 2007).

Menos freqüentemente, os estafilococos podem apresentar um nível baixo de resistência à oxacilina e à meticilina devido à produção de uma PBP estruturalmente modificada ou pela superprodução de beta-lactamases que inativam estes antibióticos (Tavares, 2000)

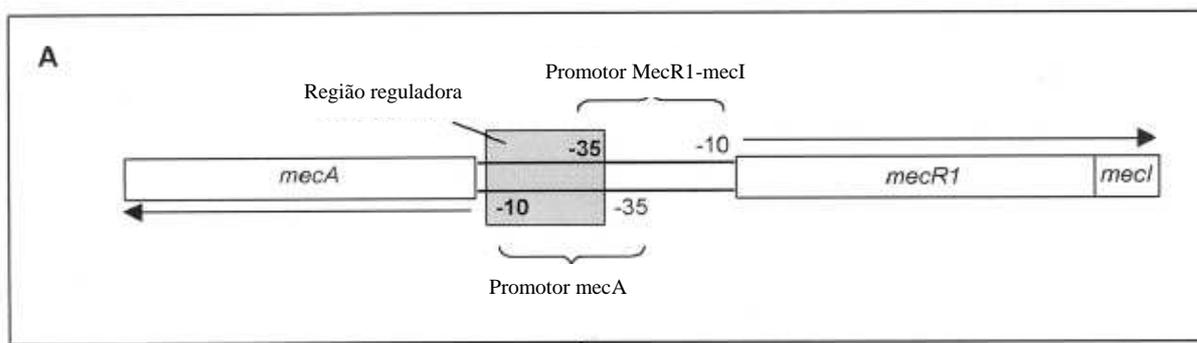


Figura 2: Representação esquemática da região codificada por *mecA-mecR-mecI*. Setas indicam direções relativas à transcrição dos genes *mecA* e *mecR1-mecI* genes (Stapleton & Taylor, , 2002).

Fatores externos que afetam resistência à meticilina incluem, entre outros, concentração de sal, pH, osmolaridade e temperatura (Matthews, & Stewart ,1984). Algumas dessas influências externas são exploradas no laboratório clínico para melhorar a detecção de cepas exibindo resistência heterogênea à meticilina; amostras são cultivados na presença de elevadas concentrações de NaCl (2%) e em baixas temperaturas (30-35°C). Ainda não se sabe porque a concentração de NaCl e a temperatura afetam esta resistência (Stapleton & Taylor, 2002).

#### 1.2.4.1. A PBP2a – Estrutura, Domínios, Centro Ativo

A característica principal do MRSA é a resistência a todos os beta-lactâmicos. Este fenômeno é causado pela presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP)

adicional, a PBP2a, codificada pelo gene *mecA* (Ryffel, 1992). A PBP2a teve sua estrutura elucidada por Strynadka e colaboradores em 2002 (Figura 4).

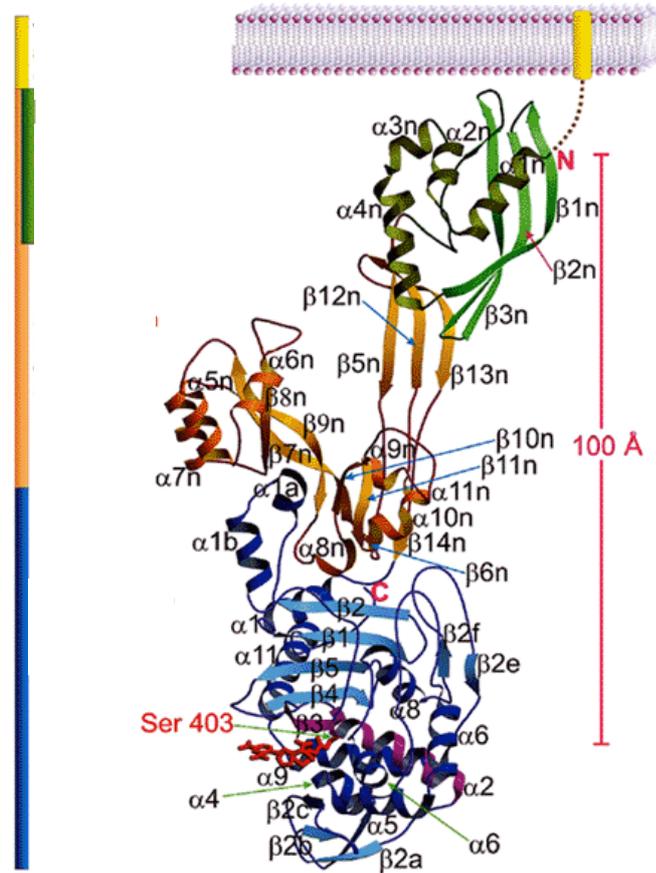


Figura 3. Estrutura da SauPBP2a. O domínio bilobular N-terminal nPB está representado em laranja, com o lobo N-terminal (extensão N-terminal) em verde. O domínio transpeptidase está em azul, com a posição do centro ativo indicado pelo anel nitrocefina, em vermelho. Os elementos da estrutura secundária do domínio transpeptidase foram marcados de acordo com o esquema de marcação usado para a R6PBP2x (*Streptococcus pneumoniae*). As regiões N e C terminal estão marcadas com N e C, respectivamente. A esquerda da representação em fita, está uma representação linear dos domínios da SauPBP2a, com o número de resíduos mostrados entre parênteses (Lim & Strynadka, 2002).

Esta enzima apresenta uma baixíssima afinidade pelos beta-lactâmicos. Desta forma, mesmo na presença destas drogas, a bactéria consegue realizar as reações de transpeptidação, necessárias para a construção da parede celular (peptidoglicano).

#### 1.2.4.2. Classificação da PBP2a

Existem quatro PBPs em *S. aureus*, PBP1, PBP2, PBP3, e PBP4. As PBPs de alto peso molecular têm dois domínios de proteínas, uma envolvida na transpeptidação e as outras envolvidas na transglicosilação ou extensão da cadeia glicana (Stapleton & Taylor, 2002).

A PBP2a é classificada como uma PBP multimodular classe II, sendo composta por uma região de ligação à membrana citoplasmática, um domínio não-transpeptidase, com uma provável ação auxiliar na reação de transpeptidação e um domínio transpeptidase, responsável pelas reações de transpeptidação da enzima (Goffin & Ghuysen, 1998).

#### 1.2.4.3. Identificação laboratorial de MRSA (CLSI)

Em laboratórios clínicos que realizam rotineiramente a identificação de MRSA, o antimicrobiano indicado para teste *in vitro* é a cefoxitina. Uma cepa de *S. aureus* resistente a cefoxitina deve ser considerada resistente a todos os  $\beta$ -lactâmicos (CLSI, 2008).

Diversos métodos tem sido utilizados para a detecção da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. Essa detecção muitas vezes pode ser difícil, principalmente devido ao fenômeno da heteroresistência. Os métodos mais usados historicamente baseiam-se em modificações na tentativa de aumentar a expressão da resistência à oxacilina. Tais modificações incluem:

- incubação a 33-35°C ao invés de 37°C;
- incubação por 24 horas, ao invés de 16-18 horas;
- adição de cloreto de sódio ao meio de cultura.

Outros métodos de identificação da resistência à metilina são a identificação do gene *mecA* por reação em cadeia de polimerase (PCR) ou a identificação da PBP2a.

### 1.3. *Staphylococcus* sp. e a expressão de fatores de colonização e virulência

#### 1.3.1. Fases do crescimento bacteriano e expressão de fatores de colonização e virulência

As fases do crescimento bacteriano estão descritas resumidamente na seguinte seqüência:

**Fase lag (Latência):** Esta é a fase de ajuste e representa o período necessário para adaptação das células ao novo ambiente. As células nesta fase aumentam no volume total em quase duas ou quatro vezes, mas não se dividem. Tais células estão sintetizando DNA, novas proteínas e enzimas, que são um pré-requisito para divisão.

**Fase exponencial ou log:** nesta fase ocorre a síntese de proteínas de superfície responsáveis pela aderência, colonização, escape do sistema imunológica. As células estão se dividindo a uma taxa geométrica constante até atingir um máximo de crescimento. Os componentes celulares como RNA, proteínas, peso seco e polímeros da parede celular estão também aumentando a uma taxa constante. Como as células na fase exponencial estão se dividindo a uma taxa máxima, elas são muito menores em diâmetro que as células na fase Lag. A fase de crescimento exponencial normalmente chega ao final devido à depleção de nutrientes essenciais, diminuição de oxigênio em cultura aeróbia ou acúmulo de produtos tóxicos.

**Fase estacionária:** durante esta fase, há rápido decréscimo na taxa de divisão celular, ocorrendo a síntese de toxinas, exoenzimas invasão e inflamação. Eventualmente, o número total de células em divisão será igual ao número de células mortas, resultando na verdadeira população celular estacionária. A energia necessária para manter as células na fase estacionária é denominada energia de manutenção e é obtida a partir da degradação de produtos de armazenamento celular, ou seja, glicogênio, amido e lipídeos.

**Fase de morte ou declínio:** quando as condições se tornam fortemente impróprias para o crescimento, as células se reproduzem mais lentamente e as células mortas aumentam

em número elevado. Nesta fase, o meio se encontra deficiente em nutrientes e rico em toxinas produzidas pelos próprios microrganismos (Keller & Surette, 2006).

Na Figura 4 estão representadas as fases acima descritas tomando como modelo o *S. aureus*. Entretanto, a figura reflete somente parte do ciclo de crescimento de uma população bacteriana (as fases lag e de declínio não estão assinaladas).

A regulação destas fases ocorre através do sistema Quorum Sensing, que será abordado posteriormente.

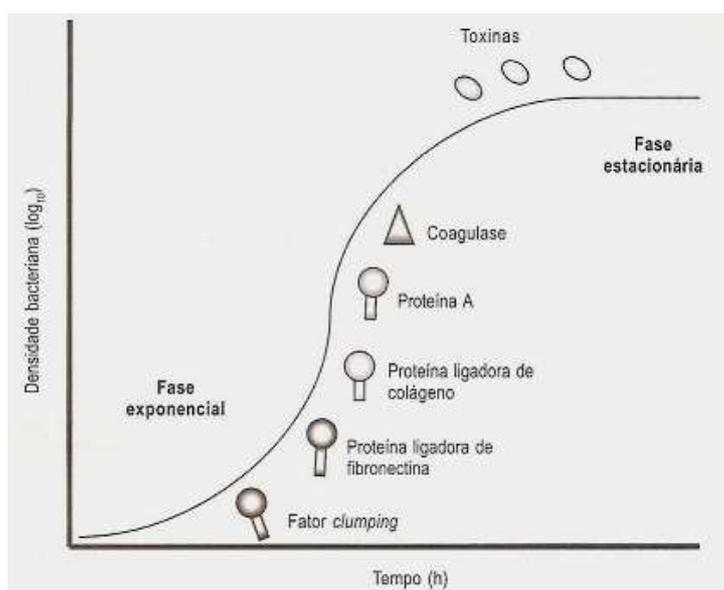


Figura 4. Relação entre curva de crescimento e expressão dos fatores de virulência em *Staphylococcus aureus* (Trabulsi *et al.*, 2004).

As bactérias podem produzir um amplo repertório de metabólitos secundários e podem responder a uma ampla variedade de produtos químicos no seu ambiente. Nos últimos anos, determinados grupos de metabólitos secundários tem sido caracterizados pelo seu papel na regulação da expressão dos genes em um sistema celular densidade-dependente, e este comportamento tem sido coletivamente referido como *quorum sensing*, ou comunicação intercelular de (Figura 5) (Keller & Surette, 2006)

### 1.3.2. Regulação da Expressão dos Fatores de Colonização e Virulência - Sistema Quorum Sensing e Agr (gene regulador acessório)

A regulação da expressão dos fatores de virulência, assim como, a habilidade de driblar o sistema imunológico do hospedeiro são fatores críticos durante um processo infeccioso. Através do sistema de *quorum sensing*, as bactérias podem “sentir” qual o melhor momento para expressar fatores de virulência e garantir que o “ataque conjunto” ao hospedeiro seja eficiente. O princípio do *quorum sensing* é simples: quando uma única bactéria libera um autoindutor no ambiente, sua concentração é muito baixa para ser detectada; no entanto, quando um número suficiente de bactérias está presente, a concentração de autoindutores alcança um nível suficiente para fazer com que as células respondam ao estímulo, ativando ou reprimindo os genes alvo. Desta forma, este sistema permite que as bactérias coordenem seu comportamento de acordo com as condições do ambiente. Isto inclui adaptação à disponibilidade de nutrientes, defesa contra outros microrganismos que podem competir pelo mesmo nutriente ou ambiente, proteção contra componentes tóxicos, expressão de fatores de virulência, produção de antibióticos, formação de biofilmes e outros (Trabulsi *et al.*, 2004).

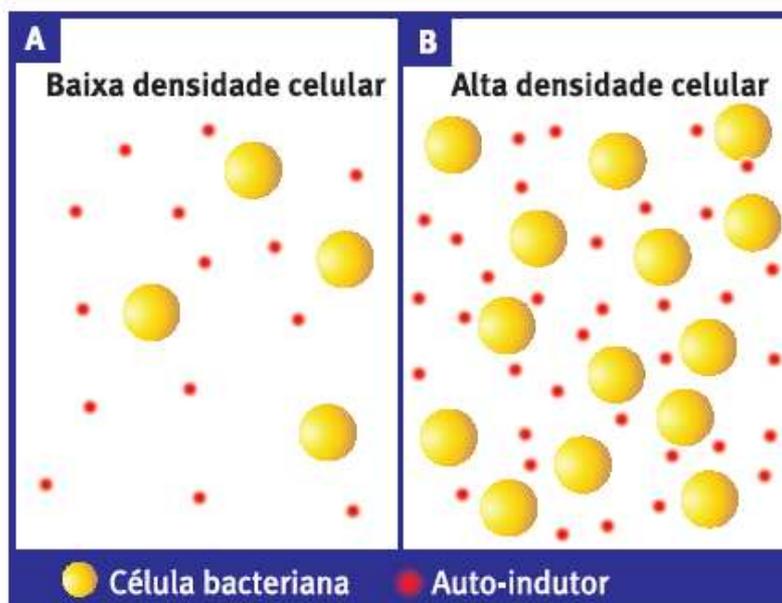


Figura 5. Princípio de funcionamento do *quorum sensing*: se há poucas bactérias em um ambiente (A), a concentração de auto-indutores, muito baixa, não é detectada, mas assim que a densidade populacional aumenta (B), essa concentração atinge um certo 'limite' e tais moléculas são 'sentidas' pelas bactérias presentes (Hardman *et al.* 1998).

### 1.3.3. MSCRAMMs

MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) são elementos da superfície bacteriana responsáveis pela colonização e virulência em bactérias Gram positivas (Foster & Höök, 1998).

Bactérias patogênicas que são essencialmente extracelulares, tais como *Staphylococcus aureus*, podendo aderir aos componentes da matriz extracelular do hospedeiro para iniciar a colonização. A aderência é mediada por proteínas de adesão de MSCRAMMs, as quais, na maioria dos casos estão covalentemente ligadas à parede celular do peptidoglicano (Foster & Höök, 1998). Na Figura 6, tem-se alguns exemplos das principais proteínas MSCRAMMs de *Staphylococcus aureus* (Marraffini *et al.*, 2006), que, como podemos observar são produzidas na fase exponencial de crescimento bacteriano, conforme ilustrado anteriormente na Figura 4.

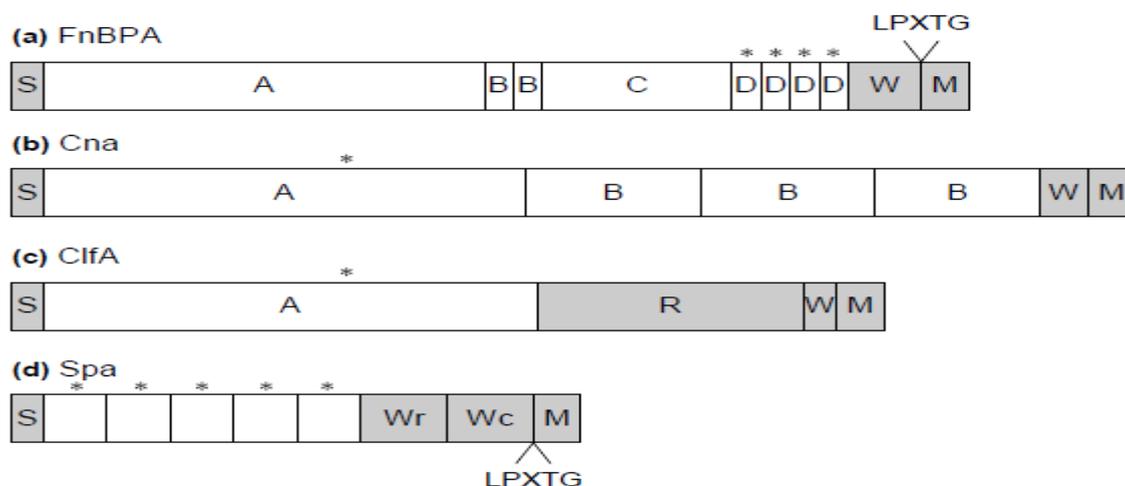


Figura 6: Organização estrutural de proteínas MSCRAMMs.

(a) FnBPA, (b) CNA, (c) ClfA e (d) Spa de *Staphylococcus aureus*. 'S' representa a seqüência sinal, 'R' representa os dipeptídeos repetidos Ser-Asp, 'W' representa o muro "wall spanning", e "M" representa a região "membrane-spanning" e resíduos carregados positivamente. W<sub>r</sub> é composto de octapeptídeos repetidos, e W<sub>c</sub> é uma região não-repetida. As posições dos aminoácidos LPXTG e dos domínios A-, B-, C-e D-s são indicados na figura. Os asteriscos indicam os domínios das ligações. (Foster & Hook, 1998).

Várias destas proteínas relacionadas vinculam moléculas da matriz extracelular e foram designadas como componentes da superfície microbiana que reconhecem moléculas de adesinas da matriz (MSCRAMMs). Estudos recentes sugerem que estas proteínas desempenham um papel importante na capacidade dos staphylococci

colonizarem tecidos (Patti, 1994). A inserção das MSCRAMMS na parede celular dos staphylococci é feita com o auxílio da enzima **sortase**, como representado na Figura 7.

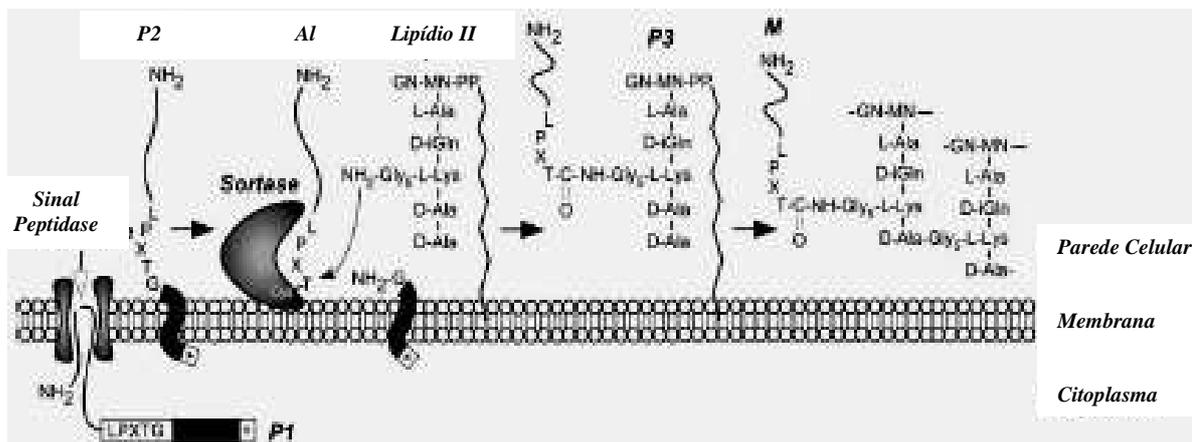


Figura 7. Representação da parede celular - proteínas de superfície em bactérias gram-positivas. Proteínas de superfície são primeiramente sintetizadas no citoplasma da bactéria como os precursores (P1), contendo uma seqüência N-terminal e uma C-terminal. A seqüência sinal se dirige à célula exportadora do polipeptídeo através do sistema Sec e, após a translocação, é clivada pelo sinal peptidase. O produto dessa reação, o precursor P2 abriga apenas o C-terminal, que é retido no interior da via secretória através do seu domínio C-terminal hidrofóbico (cor negra) e carregados positivamente na cauda (+). A sortase, uma transpeptidase de membrana ancorada com sítio ativo de cisteína, cliva o elo entre o peptídeo treonina (T) e da glicina (G) do motivo LPXTG, gerando um acil intermediário (AI). O Lipídio II, precursor da biossíntese do peptidoglicano, e sua ponte de pentaglicina (Gly<sub>5</sub>) um grupo amino ataca o acil intermediário, que liga a treonina C-terminal à proteína da superfície do lipídio II (precursor P3) e regenerando o sítio ativo da sortase. (Marraffini *et al.*, 2006).

#### 1.4. Epidemiologia de MRSA

Na última década os microorganismos gram-positivos, em especial o *Staphylococcus aureus*, emergiram como importantes agentes causadores de infecção na corrente sanguínea. Estas infecções acometem pacientes em todas as faixas etárias, com maior freqüência nos extremos de idade e apresentam pior prognóstico em pacientes com idade acima de 50 anos. Entre as infecções hospitalares, as sepses por *Staphylococcus aureus* são responsáveis por elevada morbidade e mortalidade (Moreira *et al.*, 1998).

### 1.4.1. Infecções hospitalares

As Infecções hospitalares (IH) ou nosocomiais (do grego *nosos* = doença; *comeion* = hospital) são atualmente um problema importante de saúde pública em hospitais do mundo inteiro. Estas infecções podem levar ao prolongamento da internação aumentando a morbidade e mortalidade e, conseqüentemente, a um elevado custo econômico.

Nos Estados Unidos as IH afetam mais de 2 milhões de pacientes anualmente, significando um custo de U\$ 4,5 bilhões (Gaynes, 1997). Segundo Astagneau *et al.* (1999), na França, cerca de 800.000 pacientes hospitalizados adquirem infecção hospitalar, significando um custo anual de aproximadamente U\$ 1 bilhão. Resultados do projeto SENIC (Study on the Efficacy of Nosocomial Infection Control) estimaram que se as IH fossem controladas com eficácia máxima, 20 a 30.000 óbitos poderiam ser evitados por ano nos Estados Unidos (Astagneau *et al.*, 1999).

Cerca de 5,7% dos pacientes norte-americanos hospitalizados desenvolvem uma infecção hospitalar (Emori & Gaynes, 1993), na França este número sobe para 9,3% (Astagneau *et al.*, 1999) enquanto que no Brasil, segundo dados fornecidos pela Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar, Departamento de Gestão de Políticas Estratégicas, Secretaria de Políticas de saúde do Ministério da Saúde – BRASIL (Of. 44), a taxa de IH no país é de 15,5%. O tempo médio de internação é de 11,8 dias, sendo 21,7 dias quando acometido por uma IH (Ministério da Saúde, 1999).

Entre as bactérias responsáveis por estas infecções, *Staphylococcus aureus*, juntamente com *Escherichia coli*, são os germes mais freqüentemente encontrados (Astagneau *et al.*, 1999; Emori & Gaynes, 1993; Pfaller, 1998; Resende, *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1997; Weinstein *et al.*, 1997).

As etapas das infecções causadas por *S. aureus* podem ser resumidas da seguinte maneira: freqüentemente neonatos, crianças e adultos podem ser colonizados por *S. aureus* e portar o microorganismo nas fossas nasais, e em algumas ocasiões, na pele e vestuário. A partir destes locais, os *S. aureus* podem ser transmitidos a outras regiões da pele ou mucosas; se estas barreiras são quebradas por um trauma ou cirurgia, o *S. aureus*, que é um agente patogênico oportunista, pode migrar ao local do ferimento. Devido à sua grande versatilidade, esta bactéria é capaz de provocar doenças

generalizadas de amplo espectro, variando desde infecções cutâneas menos graves a infecções invasivas graves como: bacteremia, infecções do sistema nervoso central, osteomielite, infecções do trato respiratório, urinário e síndrome do choque tóxico (Velásquez-Meza, 2005).

#### 1.4.2. Infecções comunitárias por MRSA

Durante a década de 1990, MRSA emergiu como uma causa de infecção entre as pessoas saudáveis na comunidade que não havia nenhum tipo de fatores de risco para HA-MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associado aos hospitais). Os *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina associados a comunidade - (CA-MRSA) são manifestados mais comumente na pele, infecções de tecidos moles, porém mais em infecções invasivas, incluindo sepsis, síndrome necrosante, pneumonia, e fascite, também podem ocorrer. Em um estudo de base populacional em Atlanta e Baltimore, a incidência de infecção por CA-MRSA foi mais elevada entre as crianças menores de 2 anos (Benoit et al, 2008).

Tabela 2: Tempo necessário para taxas de resistência do *Staphylococcus aureus* à penicilina, vancomicina e meticilina atingirem 25% nos hospitais e na comunidade (Chambers, 2001).

Antimicrobiano	Ano de introdução na prática clínica	Anos até primeiro relato de resistência	Anos até taxa de 25% de resistência em hospitais	Anos até taxa de 25% de resistência na comunidade
Penicilina	1941	1-2	6	15-20
Vancomicina	1956	40	?	?
Meticilina	1961	<1	25-30	45-60 (projeção)

#### 1.4.3. Prevalência de MRSA

Um estudo recente realizado nos EUA por Graham e colaboradores (2006), apontou uma prevalência de *S.aureus* e MRSA na população de 31,6 e 0,81%, respectivamente.

Com base nestes dados, podemos estimar que existam cerca de 93 milhões de portadores nasais de *S. aureus* e 2,5 milhões de portadores de MRSA nos EUA. Ainda com base nestes mesmos números, poderíamos estimar que possam existir cerca de 2

bilhões de portadores de *S. aureus* e 53 milhões de portadores de MRSA respectivamente, no mundo inteiro.

Uma busca feita por Remonato e colaboradores (2007) no site PubMed foi observado um aumento significativo do número de publicações sobre CA-MRSA de 2000 a 2006, conforme demonstra a Figura 8.

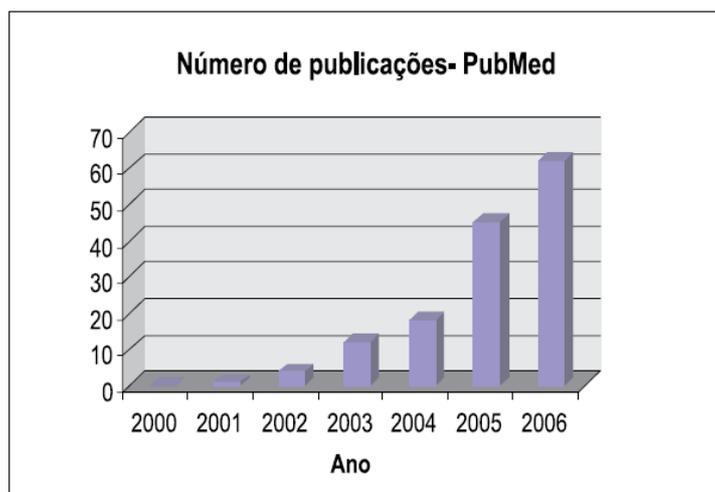


Figura 8: Número de publicações PubMed, 2000 a outubro de 2006: CA-MRSA (Remonato *et al.*, 2007)

Está em curso um programa do Sistema Europeu de Vigilância de Resistência Antimicrobiana para documentar a resistência antimicrobiana (Appelbaum, 2006). A prevalência de MRSA e mudanças na prevalência ao longo do tempo nos países participantes deste sistema são regularmente analisadas e registradas (Tiemersma *et al.*, 2004). Entre janeiro de 1999 e dezembro de 2002, 50.759 isolados nosocomiais foram coletados a partir de 495 hospitais de 26 países. A prevalência do MRSA variou entre menos de 1% no norte do Europa a mais de 40% no sul e oeste Europa. Durante este tempo, a incidência do MRSA aumentou significativamente em muitos países, incluindo Bélgica, Alemanha, Irlanda e do Reino Unido (Figura 9), destacando-se a necessidade de um melhor procedimento de controle de infecção. Nos Estados Unidos e nos países da Ásia (incluindo Taiwan, Coréia e Austrália), a incidência de isolados MRSA também está aumentando dramaticamente (Jones ME *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004 e Hsueh *et al.*, 2004). Hsueh e colaboradores (2004) relataram um aumento na prevalência de MRSA isolados de 26% para 77% entre 1986 e 2001, em Taiwan. Durante o período 1999-

2001, a prevalência do MRSA foi 64% em hospitais terciários da Coréia (Kim *et al.*, 2004). Deste modo, MRSA representa atualmente um problema crescente em escala mundial (Appelbaum, 2006).

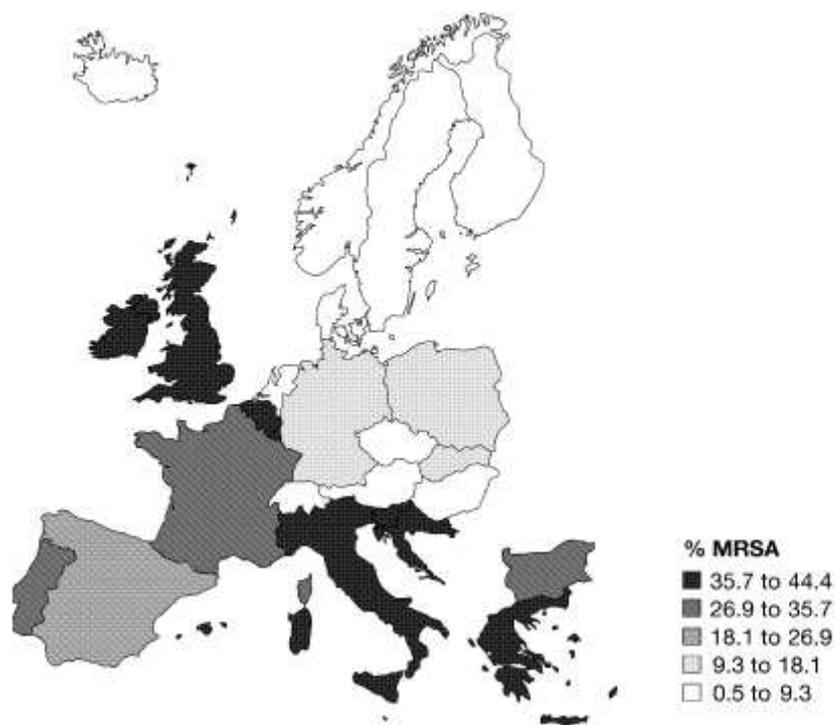


Figura 9: Percentagem de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isolados de 1999 a 2002 na Europa. (Tiemersma *et al.*, 2004).

Os dados obtidos em hospitais brasileiros também apresentam números preocupantes. Além de elevadas taxas de prevalência, especialmente em hospitais, MRSA é considerado o principal patógeno causador de surtos epidêmicos em hospitais (Beretta, 2004). Em 1986, mais de 50% das cepas nosocomiais de *S. aureus* isoladas em pacientes de hospitais universitários de São Paulo eram resistentes à meticilina (Pannuti, 1995). Em 1993, a incidência de MRSA no Hospital Pediátrico da Escola Paulista de Medicina era de 79% (Pannuti, 1995).

Um estudo realizado em hospitais de Belo Horizonte apontou uma prevalência de 71% de MRSA (Resende *et al.*, 1998).

No Brasil, na atualidade, os estafilococos, tanto o *S. aureus* como o *S. epidermidis*, mostram-se resistentes à penicilina G, ampicilina e amoxicilina em mais de 70% das cepas isoladas, seja em ambiente hospitalar ou na comunidade, não sendo mais

indicado o uso destes antimicrobianos para o tratamento de infecções estafilocócicas, mesmo que benignas e mesmo que procedam do ambiente extra-hospitalar. Além disto, estes germes vêm mostrando elevado índice de resistência à metilina (portanto, também à oxacilina e cefalosporinas) no meio hospitalar no Brasil, repetindo-se o observado em outros países. Relatos de hospitais em diferentes regiões brasileiras encontram 30% a 100% do *S. aureus* resistentes à oxacilina. Esta situação da resistência à oxacilina varia com a região e, mesmo, o hospital analisado, devendo ser avaliada localmente. A título de exemplo, na mesma época (1988), na mesma cidade (Rio de Janeiro), a resistência à oxacilina foi de 27% entre as amostras de *S. aureus* isoladas no Hospital Gaffrée e Guinle – Rio de Janeiro (sem Serviço de Emergência), enquanto que no Hospital Souza Aguiar – Rio de Janeiro (com um dos maiores Serviços de Emergência da cidade) atingiu 58%. No entanto, estes microrganismos ainda mantêm boa sensibilidade (acima de 80%) à oxacilina e cefalosporinas de primeira geração na maioria das cepas isoladas do meio extra-hospitalar no Brasil, possibilitando o uso destes antimicrobianos nas infecções estafilocócicas comunitárias (Tavares, 2000).

Um hospital de Recife, Pernambuco, revelou que com 231 pacientes colonizados por MRSA não diferiram significativamente do grupo de colonizados por MSSA ou dos pacientes não colonizados por *S. aureus*, quanto ao sexo e à faixa etária; todavia, observou-se discreto predomínio da colonização por MRSA no sexo feminino, quando comparado ao masculino, e menor acometimento por essa cepa de pacientes na faixa etária de 12 a 19 anos. Quanto à faixa etária, 12 (5,2%) eram adolescentes, 65 (28,1%) tinham idade entre 20 a 39 anos e 154 (66,7%) pacientes tinham 40 anos ou mais. Não houve associação significativa entre presença de *S. aureus* e faixa etária, porém se observou redução do número de portadores com o aumento da idade, pois nos adolescentes o percentual de portadores foi 58,3% e nos maiores de 59 anos, 31,5% (Tabela 3) (Cavalcanti, 2006). Dos pacientes analisados, 30 (13%) estavam colonizados por MRSA, 57 (24,8%) por MSSA e 144 (65,3%) não estavam colonizados. Considerando apenas os portadores de *S. aureus*, houve 34,5% e 65,5% de MRSA e MSSA, respectivamente (Tabela 4). De acordo com o motivo do internamento, a prevalência de *S. aureus* nos pacientes internados nas UTIs por razões clínicas foi de 38,7%, semelhante àquela por razões cirúrgicas (36,8%), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 3). Em relação à unidade de internamento, a frequência de MRSA foi maior na UTI de doenças infecto-parasitárias (15,4%), porém não diferiu estatisticamente das demais UTIs, onde os percentuais foram 11,1%, 13,3%

e 13,2%, respectivamente na UTI coronariana, de cirurgia cardíaca e geral (Tabela 3). Independente da cepa houve maior número de portadores de *S. aureus* entre os pacientes provenientes de hospital (n=76, 53,9%) do que entre aqueles provenientes da comunidade (n=11, 12,2%), diferença essa estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) (Tabela 4) (Cavalcanti, 2006).

Tabela 3 – Distribuição de sexo, faixa etária, motivo de internamento, procedência e unidade de internamento dos 231 pacientes segundo colonização por *S. aureus* importado para as UTIs – Hospital Universitário Oswaldo Cruz – Pernambuco - Brasil – Jan/Abr 2003 (Cavalcanti, 2006).

VARIÁVEIS	<i>Staphylococcus aureus</i>						TOTAL		
	colonizado		MSSA		não colonizado		n	%	
	MRSA								
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sexo									
masculino	14	10,9	32	24,8	83	64,3	129	55,8	
feminino	16	15,7	25	24,5	61	59,8	102	44,2	
Faixa etária (anos)									
12 – 19	01	8,3	06	50,0	05	41,7	12	5,2	
20 – 39	11	16,9	15	23,1	39	60,0	65	28,1	
40 – 59	11	13,6	20	24,7	50	61,7	81	35,1	
≥ 60	07	9,6	16	21,9	50	68,5	73	31,6	
Motivo de internamento									
clínico	15	14,2	26	24,5	65	61,3	106	45,9	
cirúrgico	15	12,0	31	24,8	79	63,2	125	54,1	
Procedência									
Hospital	27	19,1	49	34,8	65	46,1	141	61,0	
Comunidade	03	3,3	08	8,9	79	87,8	90	39,0	
Unidade de internamento									
cirurgia cardíaca	13	13,3	26	26,5	59	60,2	98	42,4	
coronariana	06	11,1	13	24,1	35	64,8	54	23,4	
doenças infecto-parasitárias	04	15,4	07	26,9	15	57,7	26	11,3	
geral	07	13,2	11	20,8	35	66,0	53	22,9	

NOTA - Resultados de testes estatísticos	MRSA X não colonizado		MSSA X não colonizado		colonizado X não colonizado	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
Sexo	1,21	0,271	0,10	0,749	0,50	0,480
Faixa etária	1,01	0,314	0,74	0,390	1,33	0,249
Motivo de internamento	0,24	0,627	0,00	0,951	0,09	0,769
Procedência	20,05	<0,001	27,73	<0,001	40,65	<0,001
Unidade de internamento	P <sub>Fisher</sub> UTI infecto-parasitárias X outras UTI = 0,421					

De acordo com a Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – RedeRM / ANVISA (2008) Os *Staphylococcus* representaram 47% de todas as notificações. A resistência à oxacilina foi verificada em 80% dos *Staphylococcus* coagulase negativo e em 61% dos *S. aureus*, nos 18 meses do monitoramento. A consistência desse resultado foi verificada testando-se o banco separadamente para o grupo de hospitais que notificaram mais de 10 isolados por ano e

para aqueles que notificaram menos de 10 isolados no período. Ambos os grupos apresentaram média de resistência de 61% à oxacilina.

Estudos de epidemiológicos baseados em técnicas de biologia molecular – em especial eletroforese de campo pulsado (pulsed-field gel electrophoresis) têm demonstrado a presença de um tipo clonal predominante (BECMRSA –Brazilian epidemic clone MRSA ou CEB – clone epidêmico brasileiro) disseminado em hospitais de todo o Brasil (Teixeira *et al.*, 1995). Este clone parece possuir uma maior capacidade de adesão proporcionada pela expressão de fatores de adesão a superfícies (Amaral *et al.*, 2005). O relato nos EUA de surtos causados por MRSA na comunidade levou a se pensar que esta possibilidade tivesse ocorrido. Porém, estudos mais detalhados mostraram que as infecções comunitárias estavam sendo causadas por um patógeno com características diferentes da cepa hospitalar. De fato, as cepas comunitárias apresentavam um perfil de sensibilidade diferente e grande parte delas possui a leucocidina Panton-Valentine, a qual leva estas infecções a serem mais agressivas (Vandenesch *et al.*, 2003). Atualmente, teme-se que as cepas comunitárias venham a se instalar no ambiente hospitalar, o que poderia levar ao desenvolvimento de uma nova cepa, tão resistente quanto a hospitalar e tão agressiva quanto a cepa comunitária.

#### **1.4.4. Colonização nasal**

O *S. aureus* é um organismo comensal presente no epitélio humano. Seu sítio ecológico primário é o vestíbulo nasal, uma região anterior no nariz (Van Belkum, 2006). O estado de portador nasal pode ser definido como persistente ou intermitente, e há ainda indivíduos não-portadores. Alguns estudos apontam para uma taxa de 25% de portadores nasais de *S.aureus*, com o restante distribuindo-se entre não-portadores e portadores intermitentes (Dall Antonia *et al.*, 2005).

O *S. aureus* coloniza primeiramente a pele e mucosa de humanos e de várias espécies animais (Heiman *et al.*, 2005). Embora vários sítios do corpo humano possam ser colonizados, a infecção da narina anterior é o mais freqüente sítio portador para *S. aureus*. Os sítios extra nasais que costumam abrigar o microorganismo podem incluir a pele, períneo e faringe. Outros sítios portadores menos freqüentes incluem o trato gastrointestinal, vagina, e axilas (Heiman *et al.*, 2005).

A colonização nasal de *S. aureus* desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de infecções por esta bactéria. Foi claramente demonstrado que este é um importante fator de risco para o desenvolvimento de infecção em certos subgrupos de pacientes (por exemplo, os doentes submetidos à hemodiálise, diálise peritoneal, e cirurgia, e os pacientes com dispositivos intravasculares e infecção pelo HIV) (Kluytmans *et al.*, 1997).

As elevadas taxas de transmissão em hospitais ocorrem porque os *S. aureus* e MRSA, a partir das narinas, podem ser transferidos ou propagados para outras áreas do corpo dos doentes, para o profissional de saúde, ou deste ao paciente. A principal via de transmissão do MRSA dentro de um hospital parece ser de doente para doente, levada pelas mãos desses profissionais. Além disso, MRSA pode existir também contaminando objetos, no ambiente, se propagando para os pacientes, e muitas vezes, através das mãos dos profissionais de saúde (Devine *et al.*, 2001).

Na Figura 10, observam-se as diferentes taxas de colonização em sítios do corpo na população em geral e em portadores nasais de *S. aureus*. Na maioria dos casos as taxas são maiores entre os portadores nasais (Heiman *et al.*, 2005).

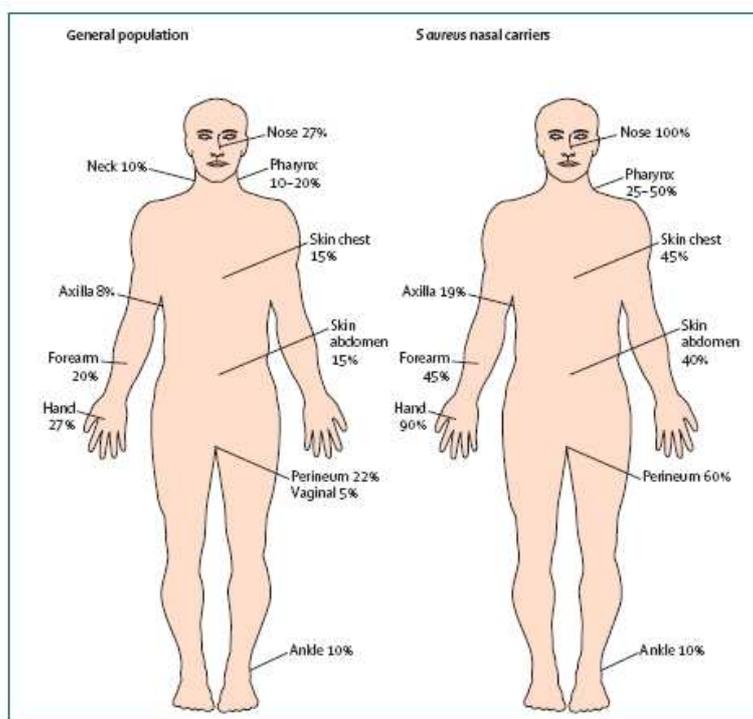


Figura 10: Taxa de adultos portadores de *S. aureus*. (Heiman *et al.*, 2005)

Dentre os fatores que afetam o êxito da infecção nosocomial de *S. aureus* estão as características fenotípicas e genotípicas das cepas, fatores do hospedeiro, esquemas de tratamento antimicrobiano e medidas de controle das infecções implementadas nas instituições (Velásquez-Meza, 2005).

Weese (2006) relatou isolamento de MRSA da mucosa nasal ou oral de 17,9% do pessoal docente em um hospital veterinário, sugerindo que o profissional Médico-Veterinário pode estar em maior risco de colonização por MRSA.

Como MRSA mostra-se mais comum em humanos, torna-se evidente que esta situação pode refletir em animais domésticos de estimação da população. Esta é uma situação inquietante, pois o potencial de ambas as doenças - humana e animal - dificultam o controle deste patógeno. A investigação de CA-MRSA em humanos deve levar em consideração o envolvimento de animais como fonte de infecção, pois estes podem adquirir MRSA no ambiente doméstico e se tornam possíveis reservatórios da infecção. Vigilância e medidas de controle das infecções devem avaliar os seres humanos e seus animais e para limitar o impacto de MRSA em ambas as populações (Weese, 2006).

A detecção da colonização por *Staphylococcus aureus* é vital para as estratégias de intervenção. Triagem de colonização nasal do MRSA utilizando métodos de diagnóstico rápido ajudam bastante no combate da infecção endógena. Os componentes da superfície microbiana são importantes na eficácia da colonização. Muitas proteínas de superfície estão sendo investigadas perante suas funções moleculares e seus potenciais para desenvolvimento de vacinas. (Van Belkum, 2006).

Agentes de saúde portadores podem estar envolvidos na disseminação de *S.aureus* entre pacientes. Senna *et al* (2003), demonstraram a presença de um mesmo clone de MRSA, tipado por eletroforese em campo pulsado (PFGE) entre pacientes de duas enfermarias distintas e agentes de saúde em um hospital de emergência. Foi observado que portadores nasais têm uma probabilidade três vezes maior de desenvolver bacteremia por *S. aureus* (Werthein *et al.*, 2005), porém, entre os pacientes não-portadores a mortalidade é aumentada significativamente (Werthein *et al.*, 2004).

A partir destes dados, pode-se supor que uma exposição prévia, no caso dos portadores, poderia levar ao desenvolvimento de anticorpos protetores, o que levaria a

quadros clínicos mais brandos em relação àqueles pacientes não-portadores, que não teriam os anticorpos em questão.

O bom conhecimento destes mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias vacinais que possam prevenir o estado de portador nasal, principalmente entre agentes de saúde.

### **1.5. *Staphylococcus aureus* e o sistema imunológica – Resposta Inata e Adaptativa**

O peptidoglicano e o ácido teicóico são constituintes da parede celular que, além de conferir rigidez à parede celular do *S. aureus*, também são fatores de virulência em alguns microrganismos. Os primeiros ativam complemento, inibem a quimiotaxia das células inflamatórias e estimulam a produção de anticorpos; o segundo tem função de aderência da bactéria às superfícies mucosas. A proteína A é outro fator de virulência por inibir a resposta imunológica (Koneman, 2001).

Em geral, a capacidade das bactérias para provocar doenças nos seres humanos é causada por evasão do sistema imunológico do hospedeiro, que inclui a resistência a antimicrobianos, destruindo leucócitos fagocitários. Na medida em que os neutrófilos ou granulócitos constituem o maior número de leucócitos nas pessoas, eles são o principal mecanismo de defesa às infecções por *S. aureus* (DeLeo *et al.*, 2009).

Os neutrófilos são responsáveis pela adesão, fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), secreção de citocinas, síntese de leucotrienos, degranulação e atividade bactericida. O contato célula-célula e a aderência também de neutrófilos ou granulócitos reforçam a função do sistema imunológico. Algumas bactérias como *S. aureus*, são agonistas dos receptores Toll-like (TLRs) e TLRs são componentes importantes para o processo de resposta patógeno-mediada (DeLeo *et al.*, 2009).

Na imunidade adquirida, acredita-se que os mecanismos de ativação da resposta imunológica dependam de um reconhecimento não específico executado pela imunidade inata. Sob esse aspecto receptores Toll (Toll-like receptors - TLRs) representam uma importante família de proteínas transmembranas, capazes de reconhecer padrões moleculares presentes numa variedade de microrganismos. As moléculas TLRs participam no reconhecimento, são expressas na interface com o ambiente local da infecção, e, além da ativação e indução da expressão de moléculas co-estimulantes,

agem sobre a síntese e ativação de citocinas como Interleucina- 1 (IL-1), IL-6, IL-12 e TNF, intervindo no segmento específico da imunidade adaptativa de defesa contra infecções (Trabulsi *et al.*, 2004).

A característica de resistência dependerá da capacidade dos indivíduos de responderem ao estímulo inicial através da ativação de células fagocíticas, como os macrófagos e os polimorfonucleares; dependerá, também, da capacidade em ativar o sistema complemento, além de produzir citocinas e fatores de crescimento, que serão secretados e estimularão a resposta adaptativa (Trabulsi *et al.*, 2004).

### **1.5.1. Evasão imunológica por Staphylococci**

A principal defesa contra a infecção por *S. aureus* é a imunidade inata através dos neutrófilos, onde o patógeno tem a capacidade de “enganar” estas células de várias maneiras. Além disso, o organismo secreta proteínas imunomodulatórias que comprometem a indução de resposta humoral e a imunidade mediada por células. Isto poderia explicar porque muitas pessoas podem sofrer repetidas infecções. Muitas vezes níveis de anticorpos são muito baixos para agirem de forma protetora e o hospedeiro é incapaz de responder às re-infecções com uma forte resposta secundária devido à depleção de células T e B (Foster, 2005).

Na fase inicial da resposta imunológica do hospedeiro à infecção, os microorganismos e os seus produtos são fagocitados por macrófagos e outras células apresentadoras de antígeno, e transportados para os nódulos linfáticos, onde as células B são estimuladas a se diferenciarem e secretarem anticorpos que se ligam aos antígenos, facilitando a fagocitose das bactérias (opsonização). Este sistema não funciona corretamente no caso de *S. aureus*, uma vez que estes anticorpos e a memória imunológica parecem ser insuficientes para prevenir infecções subseqüentes (Foster, 2005). Na tabela 4 são demonstrados alguns fatores que contribuem na evasão imunológica por *S. aureus*.

Tabela 4: Constituintes da parede celular do *S. aureus* que contribuem para a indução da resposta imunológica no hospedeiro (Santos, *et al.*, 2007)

Constituinte	Definição e funções
Ácido tecóico	Polissacarídeo espécie-específico constituído de fosfato de ribitol e N-acetilglucosamina, capaz de ativar a via alternativa do complemento e estimular a produção de citocinas
Peptideoglicano	Polímero de polissacarídeo que atua como agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleares e induz a produção de IL-1, que vai atuar como elo entre as respostas inflamatória e imunológica, e opsoninas, que revestem a bactéria, tornando-a mais facilmente fagocitada
Proteína A	Proteína ligada ao peptideoglicano presente em mais de 90% das cepas de <i>S. aureus</i> e que se liga à porção Fc da molécula de IgG, contribuindo para a geração de efeitos anticomplementares, quimiotáticos, antifagocitários, com liberação de histamina, reações de hipersensibilidade e lesão plaquetária
Cápsula	Estrutura polissacarídica que envolve a parede celular da maioria das cepas de <i>S. aureus</i> , protegendo a bactéria da fagocitose mediada pelo complemento (C3b) por parte dos neutrófilos polimorfonucleares, aumentando a virulência e a capacidade de invasão dos tecidos e da corrente sanguínea, a partir de um foco periférico, e ativando o complemento por via alternativa
Adesinas	Moléculas que fazem parte da estrutura gelatinosa do glicocálix (que envolve a célula bacteriana) e que se ligam aos receptores químicos encontrados na superfície das células epiteliais do hospedeiro, promovendo a aderência da bactéria a essas células

IL-1: interleucina 1; IgG: imunoglobulina G.

O ambiente intracelular protege os estafilococos de mecanismos de defesa, bem como dos efeitos bactericida dos antibióticos. Vesga e colaboradores (1996) demonstraram que o meio intraendotelial fomenta a formação de células de pequenas colônias variantes. Estes fatores bacterianos podem aumentar a sobrevivência e contribuir para o desenvolvimento de infecções persistentes ou recorrentes (Proctor *et al.* 1995).

O alto potencial infeccioso do *S. aureus* não está restrito apenas a sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também na produção de moléculas com grande poder patogênico, que incluem enzimas e toxinas (Santos *et al.*, 2007) (Tabela 5).

Tabela 5: Enzimas e toxinas produzidas pelo *S. aureus* que participam dos mecanismos de patogenicidade e de resistência a esse patógeno (Santos *et al.*, 2007)

Nome	Classe	Função
Betalactamases	Enzima	Inativa os antibióticos beta lactâmicos (exs.: penicilinas e cefalosporinas) pela abertura do anel betalactâmico (exs.: penicilinas e cefalosporinas)
Coagulase	Enzima	Converte o fibrinogênio em fibrina, independentemente da presença do íon Ca <sup>2+</sup> e dos fatores V, VI e VII da coagulação sanguínea, provocando a deposição de fibrina em torno do microorganismo e dificultando a fagocitose celular
Hialuronidase	Enzima	Despolimeriza o ácido hialurônico, agindo, assim, como fator de propagação do microorganismo
Catalase	Enzima	Converte o peróxido de hidrogênio, que apresentaria uma ação tóxica sobre a bactéria, em oxigênio e água
Alfatoxina (alfa-hemolisina)	Toxina	Pode apresentar quatro conformações diferentes, sendo capaz de lisar hemácias e causar danos às plaquetas em casos de intoxicações graves
Betatoxina (beta-hemolisina)	Toxina	Degrada a esfingomielina, provocando lesões na membrana dos eritrócitos e, conseqüentemente, conduzindo à hemólise
Deltatoxina (delta-hemolisina)	Toxina	Possui propriedades tensoativas, atuando como detergente e sendo responsável pelos efeitos sobre as membranas de eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas. É capaz, ainda, de inibir a absorção de água pelo íleo, devido à alteração do mecanismo de ação do monofosfato de adenosina cíclico (AMP-c), desencadeando uma diarreia aguda
Gama-toxina (gama-hemolisina)	Toxina	Apresenta atividade hemolítica, cujo mecanismo ainda não foi devidamente estabelecido
PVL	Toxina	Composta por dois componentes protéicos (S e F), que atuam sinergicamente. Essa proteína altera a permeabilidade da membrana e lisa os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos. Essa alteração permite a entrada de cátions, como o Ca <sup>2+</sup> , resultando na degranulação celular e induzindo a citólise
Esfoliatina	Toxina	Promove a clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas (síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso)
TSST-1	Toxina	Provoca febre, choque e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos, incluindo erupção cutânea descamativa
Enterotoxinas (A, B, C, D e E)	Toxina	Toxinas protéicas pirogênicas, termoestáveis, responsáveis pela intoxicação alimentar, podendo provocar vômitos e diarreias

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico; PVL: leucocidina Panton-Valentine; TSST-1: toxina da síndrome do choque tóxico.

Os diferentes tipos de toxina produzidos pelo *S. aureus* podem induzir uma resposta imunológica diferenciada para cada hospedeiro, que é responsável pelas manifestações clínicas características do processo infeccioso e que determina o grau de severidade dos sintomas sistêmicos. Podemos citar, a título de exemplo, a TSST-1 e a toxina esfoliativa estafilocócica, que podem causar as síndromes do choque tóxico e da pele escaldada (ou doença de Ritter), respectivamente, em certos pacientes, além da leucocidina de Panton-Valentine (PVL), que está associada a infecções severas de pele, furunculoses e pneumonia necrosante em crianças e jovens previamente saudáveis (Iwatsuki *et al.*, 2006).

## 1.6. Imunoterapias anti-estafilococos e MRSA

Em virtude da crescente dificuldade de tratamento das infecções causadas por *S. aureus* e em especial por MRSA, terapias alternativas ao emprego de antimicrobianos tem sido cada vez mais incentivadas. O uso de imunoterapia ativa (vacinas) e passiva (administração de anticorpos) vem sendo investigado por diversos grupos de pesquisadores.

Uma vacina contra *S. aureus* ofereceria um mecanismo para estimular o sistema imunológico a conter e erradicar o microrganismo infectante. Muitos dos indivíduos que são mais suscetíveis a infecções estafilocócicas mostram-se menos competentes para obter uma resposta imunológica eficaz. Estas são características que devem ser consideradas tanto nas estratégias de imunizações ativa e passiva (Schaffer & Lee, 2009).

Embora a compreensão da patogênese sobre *S. aureus* tenha aumentado dramaticamente nos últimos anos, as manifestações clínicas das infecções estafilocócicas ainda deixam muitas lacunas na nossa compreensão das interações entre o hospedeiro e microrganismo. Há pouca evidência de que a imunidade de *S. aureus* após infecção exista, apoiando a premissa de que a recuperação da infecção por *S. aureus* parece não conferir imunidade contra infecções subseqüentes (Schaffer & Lee, 2006).

Uma questão crucial levantada por pesquisadores é projetar uma vacina anti-estafilocócica, e quem seria a população-alvo adequada desta vacina. É necessário levar em consideração as características desta população e da patogênese das infecções por *Staphylococci*, bem os aspectos envolvidos em estratégias de imunização. No caso de pacientes infectados por *Staphylococci*, em especial em infecções hospitalares, uma vacina teria pouca utilidade para o tratamento destes pacientes, uma vez que se necessita de um tempo para o desenvolvimento de resposta imune; bem como estado dos pacientes hospitalares infectados, onde grande parte dos mesmos encontra-se imunodeprimida. Desta forma, a nosso ver a melhor indicação para o emprego de vacinas anti-*Staphylococcus* seria para a prevenção da colonização nasal – um fator responsável pela disseminação da deste patógeno (Werthein et al., ), em especial entre pacientes e agentes de saúde. Por outro lado, o emprego de anticorpos terapêuticos (em

especial anticorpos monoclonais), teriam uma ação terapêutica, sendo indicados para pacientes infectados por estas bactérias.

A seguir apresentamos alguns trabalhos envolvendo imunoterapia anti-Staphylococcus e anti-MRSA.

### **1.6.1. Vacinas anti *S.aureus***

#### **1.6.1.1. Staph Vax**

StaphVax, uma vacina conjugada composta por polissacarídeos capsulares tipos 5 e 8 e a exotoxina A detoxificada, de *Pseudomonas aeruginosa*, foi desenvolvida pelo grupo Nabi. A mesma foi testada quanto à proteção sistêmica, tendo apresentado bons resultados iniciais, reduzindo as taxas de infecção em 57% em uma população de alto risco (Vastag, 2001). Entretanto, esta vacina teve seu desenvolvimento interrompido em ensaios clínicos de fase II e III por não apresentar proteção significativa frente aos grupos controle.

#### **1.6.1.2. Vacina anti-Clumping factor (Clf B)**

Schaffer e colaboradores desenvolveram uma vacina tendo com alvo clumping factor B, uma proteína de superfície presente em *S. aureus* (MSCRAMM) com papel na colonização. Os estudos de imunização em camundongos pela via sistêmica ou intranasal com uma vacina recombinante composta pelo domínio A do Clf B apresentaram menores níveis de colonização nasal que os animais controle (não imunizados). Este estudo demonstrou que *clumping factor B* é um componente bastante atraente para utilização em vacinas para redução da colonização por *S. aureus* em humanos (Schaffer, 2006).

### **1.6.1.3. Vacina proteínas de superfície**

Stranger Jones e colaboradores (2006) testaram proteínas de superfície de parede celular para antígenos de *S.aureus* para formação de abscessos em modelo murino. Inicialmente os autores avaliaram a proteção individual conferida pela imunização com cada proteína isoladamente, em um modelo de infecção sistêmica murina com quantificação bacteriana nos rins dos animais testados. A partir destes resultados uma nova imunização foi realizada com quatro antígenos que conferiram melhor proteção individual (IsdA, IsdB, SdrD e SdrE) gerando significativa proteção imunológica, induzida através dos anticorpos opsonofagocíticos. As quatro proteínas de superfície em conjunto conferiram elevado nível de proteção em infecções invasivas ou em desafio letal com isolados clínicos de *S. aureus* em humanos. Entretanto, os autores não se preocuparam em avaliar a capacidade de descolonização nasal que poderia ser proporcionada por este modelo vacinal.

### **1.6.2. Vacinas anti-MRSA**

#### **1.6.2.1. Vacina de DNA anti-*mecA***

Ohwada e colaboradores (1999) testaram uma vacina de DNA com a seqüência do gene *mecA* para obter resposta imune e avaliar se haveria ação de proteção contra MRSA. Esta imunidade foi testada por injeção de um plasmídeo expressando o gene *mecA* em camundongos Balb/c. Anticorpos anti-PBP2 foram detectados no soro obtido a partir do DNA de camundongos vacinados. Oito dias após a quarta inoculação com  $10^8$  UFC (unidades formadoras de colônias) de MRSA em camundongos o número de bactérias presentes nos rins de camundongos vacinados com plasmídios expressando o gene *mecA* tiveram uma redução de 2,42 vezes em comparação ao controle negativo.

#### **1.6.2.2. Vacina DNA anti-fragmento da PBP2a**

Senna e colaboradores (2003) clonaram uma região interna do domínio transpeptidase da região PBP2a em um vetor plasmidial para ser usada como vacina de

DNA em um modelo murino. Foi realizada imunização pela via intramuscular com 4 doses, avaliada a resposta imune por teste de ELISA e os animais imunizados e um grupo controle foram submetidos a desafio com uma dose de subletal de MRSA administrada pela via intraperitoneal durante 7 dias em camundongos. Após o desafio, o número de bactérias recuperadas a partir de rins de animais imunizados e não imunizados de camundongos foram determinadas. Os animais imunizados apresentavam 1000 vezes menos bactérias do os controles negativos (camundongos não imunizados). Estes resultados indicam que a imunização contra a PBP2a de MRSA utilizando uma vacina de DNA poderia ser usada como uma nova estratégia para combater de forma eficaz essas bactérias multirresistentes.

### **1.6.2.3. Vacina de mucosa com vetor auxotrófico anti-PBP2a para promover a descolonização nasal por MRSA**

Senna e colaboradores (2009) desenvolveram uma vacinação de mucosa destinada a promover a descolonização nasal de animais colonizados por MRSA em um modelo murino previamente descrito (Gonzalez-Zorn *et al*, 2005). O modelo vacinal consistia de uma cepa de *Escherichia coli* modificada, capaz de que liberar genes ou proteínas no interior das células do hospedeiro. A cepa *E.coli* invasiva BM4570 é incapaz de sintetizar a parede celular devido à auxotrofia pelo ácido diaminopimélico. A mesma contém os genes *inv* de *Yersinia pseudotuberculosis* e *hly* de *Listeria monocytogenes* inseridos no cromossomo, garantindo-lhes a capacidade de penetrar nas células do hospedeiro. A cepa vacinal BM4570 foi transformada com o plasmídeo pBGS18 contendo a porção *mecA* que codifica o domínio transpeptidase, de 1,204-pb, sob promotores procariotos. Camundongos foram submetidos a inoculação intranasal com  $10^8$  UFC em 30 $\mu$ L PBS e 0.5 dap (ácido diaminopimélico), seguida de dois reforços em duas semanas. O desafio foi realizado por inoculação intranasal com a cepa COL MRSA, onde foram quantificadas a partir dos tecidos das mucosas nasais no terceiro e sétimo dia. Após o desafio, todos os animais inoculados com a transpeptidase e submetidos ao desafio tiveram uma diminuição significativa na quantificação bacteriana quando comparados aos animais controle no terceiro e sétimo dia. Seis dos nove camundongos não apresentaram MRSA na cavidade nasal no sétimo dia, enquanto todos os animais controles permaneciam colonizados.

### 1.6.3. Terapia com anticorpos monoclonais anti-*Staphylococcus*

Duas preparações de anticorpos hiperimune monoclonais (Altastaph<sup>®</sup> e Veronate<sup>®</sup>) foram recentemente avaliados para a prevenção da infecção pelo *S. aureus* em animais lactentes, mas ambos não conseguiram mostrar eficácia suficiente. A inadequada resposta imune efetora de células em prematuros podem ter contribuído à falta de eficácia nestes ensaios. Também é possível que possa ter ocorrido a baixa atividade natural dos anticorpos, uma vez que as bactérias têm evoluído para serem capazes de contornar o sistema imunológico humano. Existem três anticorpos monoclonais contra *S. aureus* atualmente em desenvolvimento clínico, Pagibaximab<sup>®</sup>, Aurexis<sup>®</sup>, e Aurograb<sup>®</sup>, mas nenhum deles ainda teve sua eficácia demonstrada significativamente.

Pagibaximab<sup>®</sup> é um anticorpo quimérico IgG1 que reconhece a superfície do ácido lipoteicóico de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Um estudo clínico de fase 2 que em lactentes em que foram dadas três doses de 60 ou 90 mg/kg demonstraram a evidência de atividade profilática, mas apenas na dose mais elevada de anticorpos, talvez refletindo novamente a pobre resposta imunológica em prematuros.

Aurexis<sup>®</sup>, um anticorpo IgG1 humanizado para *S. aureus* - Clumping Factor A (ClfA), uma proteína implicada na mediação e aderência ao endotélio danificado e inibindo a fagocitose, tem atividade em profilática e terapêutica em coelhos como modelo animal. Resultados de um estudo clínico Fase 2 em que uma única dose de 20 mg/kg de Aurexis<sup>®</sup> foi administrado em doentes adultos com bacteremia por *S. aureus* demonstrou respostas não estatisticamente significativas, embora não ter havido óbitos e agravamento de sepse no grupo de pacientes tratados.

Aurograb<sup>®</sup> é um anticorpo de cadeia única de fragmento variável (scFv) que se liga à proteína de superfície de *S. aureus* (GrfA). GrfA é uma bomba de efluxo de drogas e o Aurograb aumenta a sensibilidade do *S. aureus* à vancomicina, pela inibição da bomba. Como o Aurograb<sup>®</sup> não possui a região Fc, e é esperado que tenha uma meia vida de poucos minutos *in vivo*, exigindo a administração de doses frequente. Os estudos de fase 2 do Aurograb<sup>®</sup> (duas doses de 1 mg/kg por dia), em combinação com vancomicina não conseguiram demonstrar eficácia em infecções por *S. aureus* (Bebbington & Geoffrey, 2008).

### **1.7. Objetivos do Trabalho**

A presente dissertação tem por objetivo principal analisar amostras de soro de pacientes colonizados e infectados por MRSA e proceder a identificação de anticorpos anti-PBP2a. Será feita a análise clínico-epidemiológica dos pacientes infectados ou colonizados por MRSA, juntamente com os resultados obtidos de pesquisas de anticorpos anti - PBP-2 MRSA. Os resultados obtidos nos permitirão uma melhor compreensão da resposta imunológica na evolução das infecções por MRSA e avaliar o potencial deste alvo para o desenvolvimento de estratégias baseadas em imunoterapia.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Amostras**

Para este estudo foram selecionadas amostras de soro de pacientes colonizados por MRSA, obtidos junto ao Hospital do Amparo – Rio de Janeiro – RJ. Esta etapa contou com a assessoria da Comissão de Controle de Infecções Hospitalares e do Laboratório Richet, responsável pelo serviço de bacteriologia. Foram considerados pacientes colonizados aqueles em que foi identificada a presença de MRSA sem sinais clínicos de infecção, a identificação de MRSA foi realizada pelo laboratório Richet através do método automatizado Microscan WalkAway (Dade Behring).

As amostras coletadas foram devidamente registradas com os dados referentes ao paciente, como: idade, sexo, doença de base, data da primeira identificação de MRSA, tratamento com antimicrobianos. Foram seguidos os princípios éticos vigentes, onde a identidade dos pacientes foi preservada. Os operadores trabalharam somente com uma numeração referente a cada soro. O trabalho foi realizado mediante termo de consentimento para a realização do estudo fornecido pelo Comitê de Ética do Hospital do Amparo, como também foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz (Ver anexo). Os pacientes foram identificados por numeração, preservando a identidade dos mesmos.

A cepa MRSA CEB foi gentilmente cedida pela Dra. Agnes Figueiredo do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e empregada neste estudo.

## 2.2. Identificação de anticorpos anti-PBP2a

### 2.2.1. Teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Em placas Maxisorb de 96 poços foi adicionado 100  $\mu$ L por poço de uma solução contendo 5  $\mu$ g/mL da proteína recombinante semi purificada (PBP2a) diluída em tampão carbonato/bicarbonato (0,1M, pH 9,6). As placas foram cobertas com plástico e incubadas durante toda a noite a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS (phosphate buffered saline) contendo 0,05% de Tween 20. Adicionou-se 100  $\mu$ L/poço da solução de bloqueio (PBS 1x contendo 5% de leite desnatado) e as placas foram incubadas por duas horas a 37°C. Após o bloqueio foram feitas três lavagens com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e adicionou-se o conjugado anti-IGs humano marcado com peroxidase (lote 073HPO20-DES - BioManguinhos) diluído 1:5000 em PBS contendo 5% de leite desnatado. As placas foram incubadas por noventa minutos a 37°C. Após 3 lavagens com PBS-tween20, foi realizado o preparo do substrato (TMB BioRad) de acordo com as instruções do fabricante e incubado a 20 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N (100  $\mu$ l/poço) e a leitura das absorvâncias foi feita em um espectrofotômetro com filtro a 490 nm (Microplate Reader Model 680 (BioRad - USA)).

Foi utilizado um branco de reação e soros controle (paciente normal e paciente infectado por *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina – MSSA) para análise e interpretação dos resultados.

### 2.2.2. Western blot

Em virtude de não dispormos de um controle positivo humano, as amostras com valores superiores aos controles negativos (soro de pacientes não infectados ou soro de pacientes infectados por cepas de *S.aureus* sensíveis a meticilina), foram submetidas ao Western blot contra a proteína purificada e também contra um lisado de MRSA, para a observação de anticorpos contra a PBP2a nativa e demais proteínas de superfície.

### 2.2.2.1 Western blot contra a PBP2a purificada

A proteína purificada (PBP2a) foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE – sodium dodecyl sulphate – polyacrilamide gel electrophoresis) a 15%. Após esta etapa a proteína foi transferida para uma membrana de nitrocelulose de 0,2 mm em um sistema de transferência vertical (BioRad), por 60 minutos a 90 volts. A proteína foi visualizada utilizando o corante Ponceau. Foram recortadas tiras horizontais da membrana contendo a proteína para análises individuais de cada amostra de soro dos pacientes. As tiras foram bloqueadas em 15 mL de tampão de bloqueio [ 25 mM tris.HCl pH 8,0; 0,15 M NaCl, leite desnatado 10% e albumina bovina (BSA) 1%)] sob agitação suave à temperatura ambiente durante toda a noite. As membranas foram lavadas três vezes por cinco minutos em tampão NTT (NT + triton 0,2%) seguidas de mais três lavagens por 5 minutos em tampão NT. As tiras foram incubadas com soro diluído a 1:250 em TBS por duas horas sob agitação suave a temperatura ambiente (25°C). Após este período, as tiras foram lavadas como descrito anteriormente (NTT, NT), adicionou-se o conjugado anti-IgG humana (Sigma) em tampão NT-BSA 0,3% (2µL por 30 mL de tampão TBS) e incubou-se as amostras por 2 horas sob agitação suave à temperatura ambiente (25°C). Após esta etapa as tiras foram novamente lavadas em NTT e NT e foi realizada a revelação com a adição do substrato (Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate kit – BioRad) até a identificação visual das bandas, quando se procedeu ao bloqueio da reação por lavagem com água.

OBS: A proteína recombinante correspondendo a um fragmento da PBP2a, de MRSA foi obtida após amplificação do DNA por reação em cadeia de polimerase, clonagem em vetor de expressão em *Escherichia coli*. Superexpressão por indução com IPTG (isopropiltiogalactosídeo), lise e purificação por HPLC (high performance liquid chromatography). Não podemos fornecer maiores detalhes da metodologia, pois o processo de solicitação de patente encontra-se em andamento.

### **2.2.2.2 Western blot contra proteínas de superfície de MRSA**

Para a análise de anticorpos contra proteínas de superfície e contra a PBP2a integral, seguimos o protocolo descrito por Lorenz e colaboradores (2000) com algumas modificações.

Para o preparo do lisado foi utilizado um precipitado de MRSA correspondente a 500  $\mu$ L de cultura centrifugada. O sobrenadante foi desprezado e a amostra foi ressuspensa em 100  $\mu$ L de TE. Adicionou-se pérolas de vidro de 106 micrômetros de diâmetro (Sigma G4649), e as amostras foram submetidas a três ciclos de agitação (30 segundos) em Mini BeadBeater (Biospec Products – EUA). Após lise estas foram centrifugadas, retirando-se o sobrenadante e acrescentou-se tampão Laemli, com subsequente aquecimento 100°C/10 minutos e aplicação de 5  $\mu$ L em um gel de poliacrilamida 17%. As demais etapas realizadas foram as mesmas empregadas para a proteína purificada.

### **2.3. Extração de imunoglobulinas dos soros dos pacientes**

Para a purificação das imunoglobulinas presentes no soro dos pacientes, empregamos o sistema Protein G Sepharose High Performance, do kit Ab SpinTrap (GE healthcare – EUA), que inclui as seguintes etapas: ligação, lavagem e eluição.

Inicialmente, uma minicoluna foi agitada suavemente para homogeneizar a resina. Posteriormente, a base da coluna foi quebrada e colocada dentro de um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL. A minicoluna foi centrifugada por 30 segundos a 1000 rpm para a remoção do líquido conservante, equilibrada com 600  $\mu$ L do tampão de ligação (binding buffer) e centrifugada como citado anteriormente. Em sequência foi adicionado soro (volume máximo de 600  $\mu$ L), sendo a seguir minicoluna tampada e incubada por 4 minutos com agitação suave à temperatura ambiente. Após o período a tampa da coluna foi retirada e a minicoluna colocada em um tubo eppendorf para centrifugação por 30 segundos a 1000 rpm. Após este procedimento foi efetuada a lavagem por 3 vezes com 600  $\mu$ L do tampão de ligação e centrifugada.

Foram adicionados 400  $\mu$ L de tampão de eluição (elution buffer) na coluna e no

fundo do eppendorf 30µL do tampão de neutralização e centrifugado por 30 segundos a 1000 rpm, repetindo-se esta operação foi repetida para obtenção de um segundo eluato. Para um maior aproveitamento do soro foi feita uma segunda purificação em uma nova coluna (Ab Spin Trap), seguindo o processo acima descrito para obtenção de maior quantidade uma amostra.

A quantificação das imunoglobulinas purificadas foi realizada pelo método de Lowry (BioRad), utilizado um padrão de BSA sérica.

## **2.4. Ensaios de proteção *in vitro***

### **2.4.1. Ensaio em placa**

Este ensaio foi adaptado a partir dos métodos preconizados para a determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos por microdiluição em caldo. (Société Française de Microbiologie, CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute).

Uma colônia da cepa MRSA CEB foi inoculada em 10 mL de caldo de Luria contendo 5µg/mL de oxacilina em um tubo Falcon de 50 mL e incubada durante toda a noite a 37°C a 120 rpm. No dia seguinte, 100 µL desta amostra foi inoculada em 10 mL de caldo de Luria contendo 5µg/mL de oxacilina até alcançar a absorvância de 0,6 medida a 600 nm em espectrofotômetro (Genosys 10 UV -EUA). Em uma microplaca de cultura de células de 24 poços (Iwaki-Japão) foram adicionados em cada cavidade, 2 mL de caldo Müller-Hinton, das imunoglobulinas purificadas do soro dos pacientes nas concentrações de 0,4; 0,6 e 0,8 mg como também de 1,5 e 2,0 mg e um inóculo contendo cerca de 10<sup>4</sup> bactérias (uma alíquota do inóculo foi submetida a diluições seriadas em salina estéril e semeada em placas contendo agar Müller-Hinton com oxacilina (5µg/mL) e incubadas em estufa a 37°C durante toda a noite; após 18 horas, o número de colônias foi anotado e multiplicado pelas respectivas diluições). As amostras foram incubadas por 18 horas a 37°C, e a turgidez foi registrada. As imunoglobulinas purificadas correspondiam as seguintes amostras: pool de soros positivos para PBP2a em Western blot; soro obtido de paciente colonizado por uma cepa de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), um soro normal, obtido de uma paciente não colonizado por *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus coagulase* negativa. Os

ensaios foram realizados em duplicata e com um controle positivo (inóculo bacteriano + caldo Muller-Hinton).

#### **2.4.2. Ensaio cinético de proteção *in vitro***

Uma colônia da cepa MRSA CEB foi inoculada em 10 mL de caldo de Luria contendo 5 µg/mL de oxacilina em um tubo Falcon de 50 mL e incubada durante toda a noite a 37°C a 120 rpm. Em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Müller-Hinton adicionou-se 1 mg das imunoglobulinas purificadas (i) dos soros dos pacientes infectados por MRSA (*pool*), (ii) do soro de um paciente colonizado por MSSA, (iii) do soro de um paciente normal. A cada tubo adicionou-se uma alíquota do pré-inóculo contendo aproximadamente  $10^4$  bactérias (quantificado como previamente descrito). As amostras foram incubadas a 37°C, com agitação de rpm. A partir da terceira hora de incubação e a cada hora subsequente, uma alíquota de cada amostra foi retirada e submetida à leitura de absorvância a 600 nm e quantificação bacteriana, conforme previamente descrito. Um controle positivo (caldo Müller-Hinton e o inóculo bacteriano) também foi submetido ao processo de incubação, leitura de absorvância e quantificação bacteriana.

#### **2.5. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (Antibiograma).**

As cepas MRSA isoladas dos pacientes colonizados foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos no Laboratório Richet, empregando o sistema de Automação MicroScan WalkAway (Dade Behring).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1. Características da amostras**

Foram selecionadas 53 amostras referentes a 40 pacientes onde em alguns casos as amostras foram coletadas em diferentes etapas da internação. Dentre os pacientes, 32 estavam colonizados e 8 infectados por MRSA.

A identificação de MRSA nos pacientes colonizados/infectados ocorreu predominantemente no período inicial de internação. MRSA foi identificado em 52% dos pacientes na primeira semana de internação, 17% na segunda semana e os restantes (31%) após este período. Não foi possível saber o percentual de pacientes que já se apresentavam colonizados no momento da internação.

Dentre os pacientes analisados 11% estavam na faixa etária de 35 a 50 anos, 14% de 51 a 65 anos, 40% de 66 a 80 anos e 35% estavam na faixa etária acima de 81 anos, no entanto, ressalta-se que dentre os 40 pacientes estudados em 17 deles não foi possível analisar suas fichas clínicas, conforme Tabela abaixo, onde a antibioticoterapia e outras informações não puderam ser coletadas.

A maior parte das amostras (49) foram provenientes de pacientes internados na UTI (Unidade de Terapia Intensiva).

Dentre os 24 pacientes analisados portadores de MRSA um quarto deles (6) foi a óbito por complicações diversas, e os demais tiveram alta hospitalar com atendimento domiciliar, onde os mesmos permaneceram colonizados, e um quarto (6) destes retornou ao hospital com diagnóstico positivo para MRSA.

Os isolamentos de MRSA foram feitos em sua maioria em amostras de swab nasal (60%), com os demais isolamentos sendo feitos a partir do sangue/hemoculturas (21%), secreção traqueal (16%) e secreção de próteses ou dreno (3%). Em praticamente todos os isolamentos de MRSA os pacientes estavam sendo submetidos à

antibioticoterapia, no entanto, não foi possível avaliar em que momento a mesma foi incorporada ao tratamento.

A Tabela 6 resume os dados gerais de cada paciente e os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 6: Dados gerais e resultados sorológicos dos pacientes.

Nº Paciente	Idade	Internação Hospitalar	Material coletado	Colonizado/Infectado	Intervalo internação / coleta (dias)	Tratamento com Antibiótico	ELISA	Western blot
15(72)	83	UTI	Sangue	Infectado	7	-	+	-
16(17,18,19)	58	UTI	Sangue	Infectado	7	Sim	+	+
17(16)	58	UTI	Sangue	Infectado	16	Sim	+	+
18(16)	58	UTI	Sangue	Infectado	23	Sim	+	+
19(16)	58	UTI	Sangue	Infectado	30	Sim	+	-
20(21,22,23)	73	UTI	Sangue	Infectado	7	-	+	+
21(20)	73	UTI	Sangue	Infectado	7	-	+	-
22(20)	73	UTI	Sangue	Infectado	7	-	+	+
23(20)	73	UTI	Sangue	Infectado	7	-	+	+
24	92	UTI	Swab Nasal	Colonizado	14	Sim	+	+
25(26)	82	UTI	Swab Nasal	Colonizado	92	Sim	+	+
26(25)	82	UTI	Swab Nasal	Colonizado	106	Sim	+	+
27	52	UTI	Swab Nasal	Colonizado	14	Sim	+	-
28	78	UTI	Swab Nasal	Colonizado	2	Sim	+	-
29(76)	69	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	Sim	+	-
30	91	UTI	Swab nasal	Colonizado	15	Sim	+	-
31	93	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	-	+	+
32	84	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	Sim	+	+
33	77	UTI	Swab Nasal	Colonizado	5	Sim	+	+
34	90	UTI	Swab Nasal	Colonizado	5	Sim	+	-
35	89	UTI	Swab nasal	Colonizado	1	-	+	-
36(37)	91	UTI	Secreção Traqueal	Colonizado	2	Sim	+	-
37(36)	91	UTI	Secreção Traqueal	Colonizado	5	Sim	+	-

Continuação tabela 6: Dados gerais e resultados sorológicos dos pacientes.

<b>Nº Paciente</b>	<b>Idade</b>	<b>Internação Hospitalar</b>	<b>Material coletado</b>	<b>Colonizado/Infectado</b>	<b>Intervalo internação / coleta (dias)</b>	<b>Tratamento com Antibiótico</b>	<b>ELISA</b>	<b>Western blot</b>
38	78	UTI	Secreção traqueal	Colonizado	5	Sim	+	+
39(40)	63	UTI	Swab Nasal	Colonizado	178	-	+	-
40(39)	63	UTI	Swab Nasal	Colonizado	178	-	+	-
41(42,43)	74	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	Sim	+	-
42(41)	74	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	Sim	+	-
43(41)	74	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	Sim	+	+
44	75	UTI	Swab Nasal	Colonizado	28	-	+	+
45	78	UTI	Swab Nasal	Colonizado	5	-	+	+
46	75	Leito	Secreção de traqueal	Colonizado	13	Sim	+	-
47(48)	54	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	Sim	+	+
48(47)	54	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	Sim	+	+
49(50)	69	UTI	Swab Nasal	Colonizado	7	Sim	+	+
50(49)	69	UTI	Swab Nasal	Colonizado	7	Sim	+	+
51(78)	82	UTI	Swab Nasal	Colonizado	86	-	+	-
52(53)	80	UTI	Swab nasal e secreção traqueal	Colonizado	20	Sim	+	-
53(52)	80	UTI	Swab nasal e secreção traqueal	Colonizado	20	Sim	+	-
54	89	UTI	Swab Nasal	Colonizado	33	Sim	+	-
55	46	Leito	Secreção de óstio e dreno	Colonizado	7	Sim	+	-
56	89	UTI	Swab Nasal	Colonizado	118	-	+	-

Continuação tabela 6: Dados gerais e resultados sorológicos dos pacientes.

<b>N° Paciente</b>	<b>Idade</b>	<b>Internação Hospitalar</b>	<b>Material coletado</b>	<b>Colonizado/Infectado</b>	<b>Intervalo internação / coleta (dias)</b>	<b>Tratamento com Antibiótico</b>	<b>ELISA</b>	<b>Western blot</b>
69(70; 71)	50	UTI	Hemocultura e Secreção Traqueal	Infectado	11	Sim	-	Não realizado
70(69)	50	UTI	Hemocultura e Secreção Traqueal	Infectado	11	Sim	-	Não realizado
71(69)	50	UTI	Hemocultura e Secreção Traqueal	Infectado	11	Sim	-	Não realizado
72(15)	83	UTI	Secreção da prótese de Joelho	Infectado		-	-	Não realizado
73	45	UTI	Swab nasal	Colonizado	13	Sim	-	Não realizado
74	69	Leito	Swab Nasal	Colonizado	19	Sim	-	Não realizado
75	63	Leito	Swab Nasal	Colonizado	3	Sim	-	Não realizado
76(29)	69	UTI	Swab Nasal	Colonizado	1	-	-	Não realizado
77	35	UTI	Swab nasal	Colonizado	4	Sim	-	Não realizado
78(51)	82	UTI	Swab Nasal	Colonizado	86	-	-	Não realizado
79	83	UTI	Swab Nasal	Colonizado	231	-	-	Não realizado

## 3.2. Imunoensaios

### 3.2.1 ELISA

Os resultados obtidos indicaram que 40 amostras (71%) foram positivas para anticorpos anti-PBP2a, e 16 (29%) amostras negativas conforme demonstrado na figura 11.

Foram analisadas 2 amostras de soro de pacientes infectados por *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e os valores de absorvância observados foram utilizados como valor de corte para caracterizar as amostras como positivas ou negativas. Todas as amostras foram analisadas pelo ELISA.

Pela análise estatística no teste de Kruskal-Wallis, obtivemos o valor de  $P < 0,01$  considerando então os resultados estatisticamente significativos.

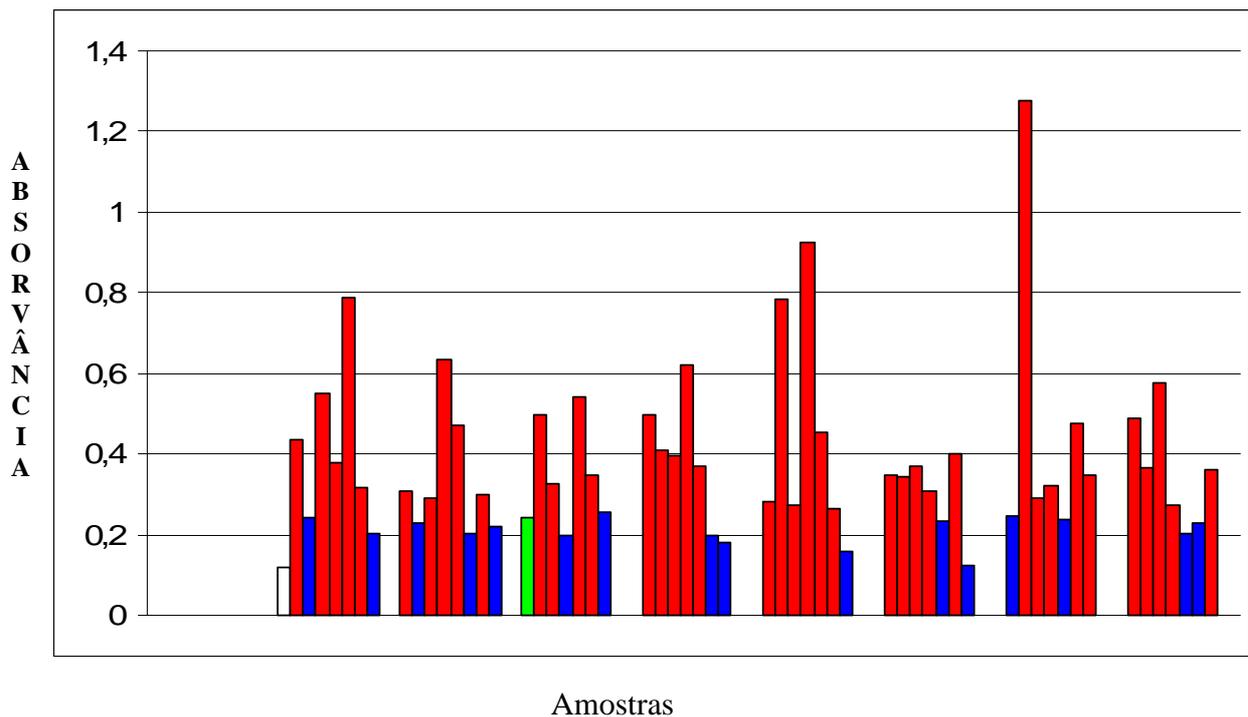


Figura 11: Resultados referentes ao ELISA. Cada barra corresponde a uma amostra de soro dos pacientes selecionados para este estudo. A barra incolor refere-se ao controle negativo, em vermelho, são as amostras consideradas positivas, em azul, as consideradas negativas, em verde a absorvância do soro de pacientes infectados por MSSA e a. Uma vez que a cepa MSSA não possui PBP2a, os valores acima da absorvância de 0,242 para estas amostras foram consideradas como resposta específica para a PBP2a presente nas cepas MRSA.

### 3.2.2. Western blot

#### 3.2.2.1 – Western blot - anticorpos anti PBP2a

Dentre as amostras submetidas à confirmação por Western blot, 20 delas foram positivas e 22 negativas, sugerindo que haja uma resposta imunológica específica durante a colonização por MRSA mesmo após 1 dia de infecção. Desta forma as amostras positivas no ELISA e na Western blot foram consideradas positivas e as amostras positivas no ELISA e negativas na Western blot foram descartadas devido a provável reação falso-positiva no ELISA e/ou baixa concentração de anticorpos anti-PBP2a no soro.

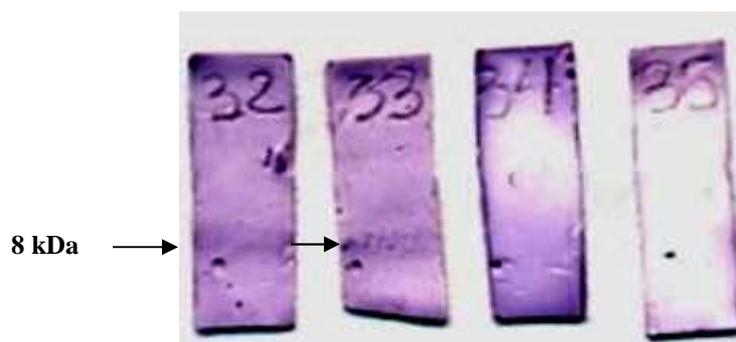


Figura 12: Representação de amostras positivas e negativas no ensaio de Western blot para detecção de anticorpos anti-PBP2a em soro de pacientes colonizados por MRSA. Em 32 e 33: amostras positivas apresentando uma banda de aproximadamente 8kDa correspondente ao fragmento da PBP2a(proteína recombinante). Em 34 e 35: amostras negativas.

#### 3.2.2.2. Western blot– proteínas de superfície de MRSA

Em maior ou menor intensidade, praticamente todas as amostras apresentaram uma banda em torno de 76-80 kDa, peso molecular da PBP2a e da PBP2 de *Staphylococcus aureus*. A PBP2 é uma enzima essencial à formação da parede bacteriana pois é a única PBP de estafilococos capaz de realizar reações de transglicosilação (Goffin & Ghuysen, 1998). Entretanto, devido à proximidade do peso molecular das duas proteínas, não foi possível

diferenciá-las no gel. Foram observados anticorpos direcionados contra outras proteínas de superfície de MRSA. A maior parte dos soros apresentou anticorpos contra proteínas imunodominantes descritas por Lorenz e colaboradores (2000), em especial uma de 29 e outra de 17 kDa, respectivamente (Precision plus Protein™ Standards – BioRad cat. 161-0363). Além destas, foram observados anticorpos contra proteínas de 50 kDa e 37 kDa na maioria das amostras analisadas.

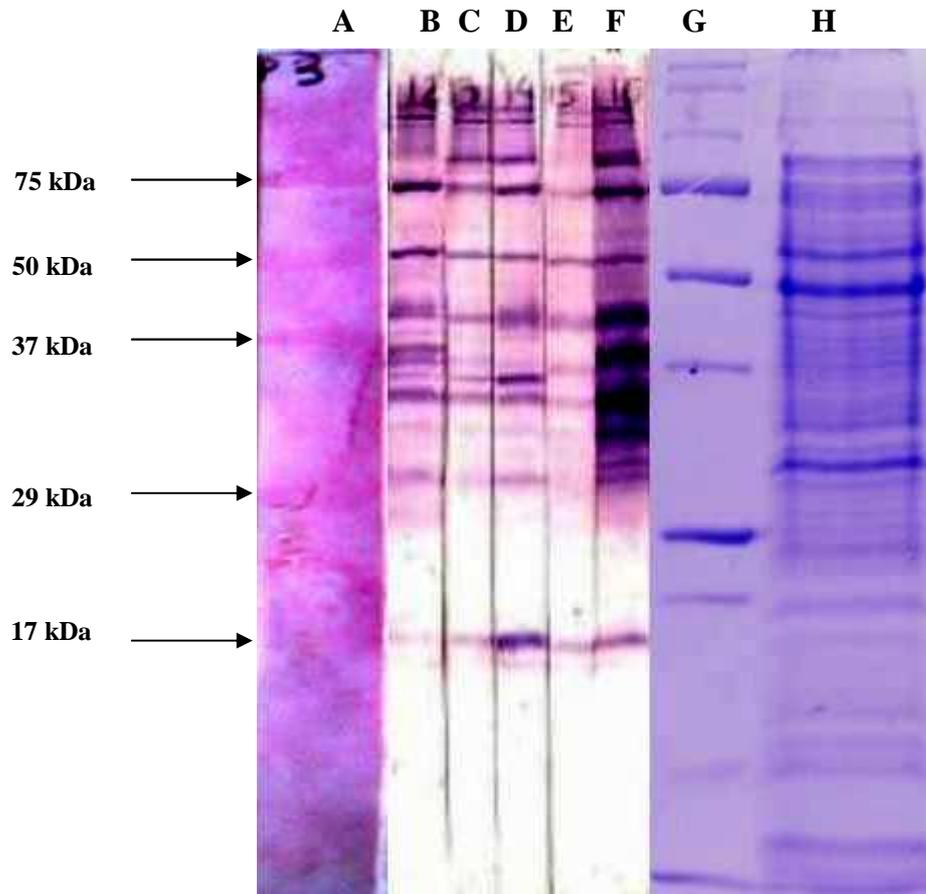


Figura 13: Western blot de soro de pacientes proteínas de superfície de lisado de MRSA. A esquerda estão identificados os pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) presentes no marcador de peso molecular em A, B, C, D, E, F: Western blot de amostras de diferentes soros de pacientes colonizados. Em G e H: Gel SDS-PAGE, demonstrando o marcador de peso molecular (G), e as proteínas de superfície de lisado de MRSA (H).

### 3.3. Extração e purificação das Imunoglobulinas

Foram selecionadas amostras positivas no teste de ELISA e da Imunohibridização *in situ* (immunoblotting), uma amostra de um paciente colonizado por uma cepa MSSA (PBP2a negativa), uma amostra de soro de um paciente normal (não colonizado/não infectado) por MRSA ou MSSA empregando o sistema Ab Spin Trap (GE). Foi observada grande quantidade de imunoglobulinas presentes no eluato, sendo então, submetido novamente ao processo de purificação para aumentar o rendimento final, onde os resultados podem ser vistos na Figura 14.

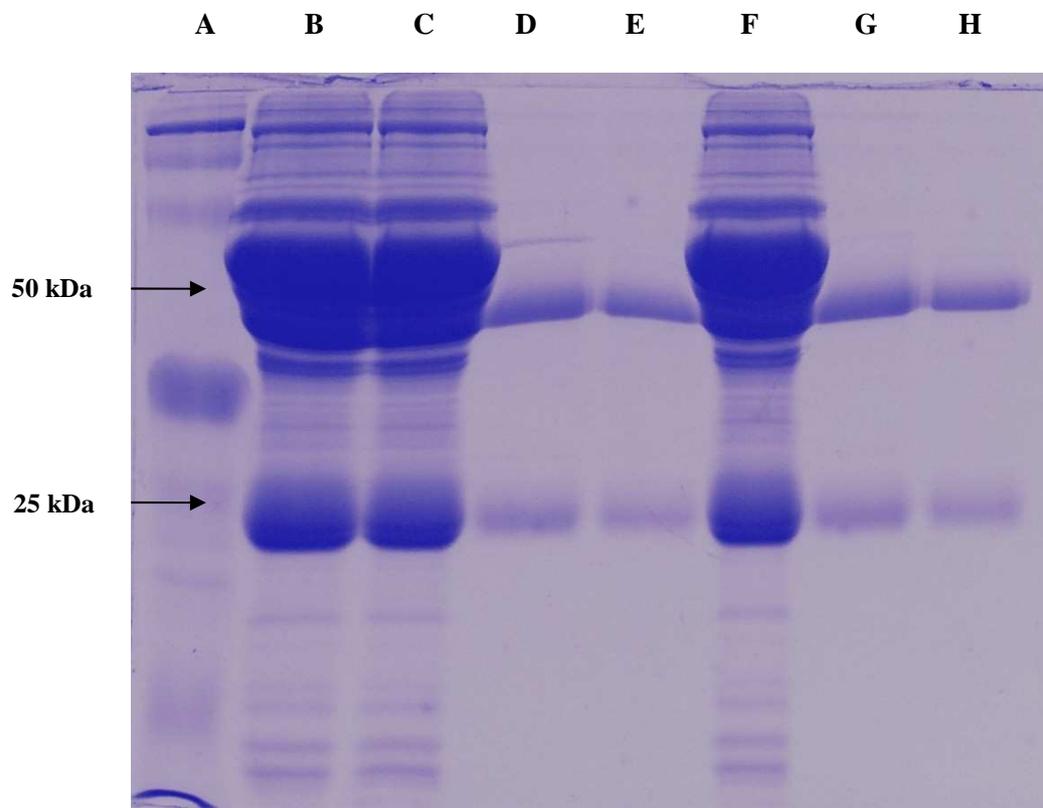


Figura 14: Gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) com amostras do soro de pacientes antes e após purificação de imunoglobulinas pelo sistema Ab SpinTRap (GE). A. Marcador de peso molecular; B e C: soro total antes da purificação; D e E: Imunoglobulinas purificadas; F: eluato (amostra após purificação); G e H: imunoglobulinas purificadas a partir do eluato.

### 3.4. Ensaios de proteção *in vitro*.

#### 3.4.1. Determinação da concentração inibitória mínima em placa.

Este ensaio foi realizado com o objetivo de observar a inibição do crescimento bacteriano em presença das imunoglobulinas purificadas, não foi possível identificar uma concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, entretanto foi observado apenas uma ligeira diminuição da turgidez nas amostras incubadas na presença das imunoglobulinas isoladas a partir do soro de pacientes colonizados por MRSA que obtiveram resultado positivo para presença de anticorpos anti-PBP2a, como observado na Figura 15.

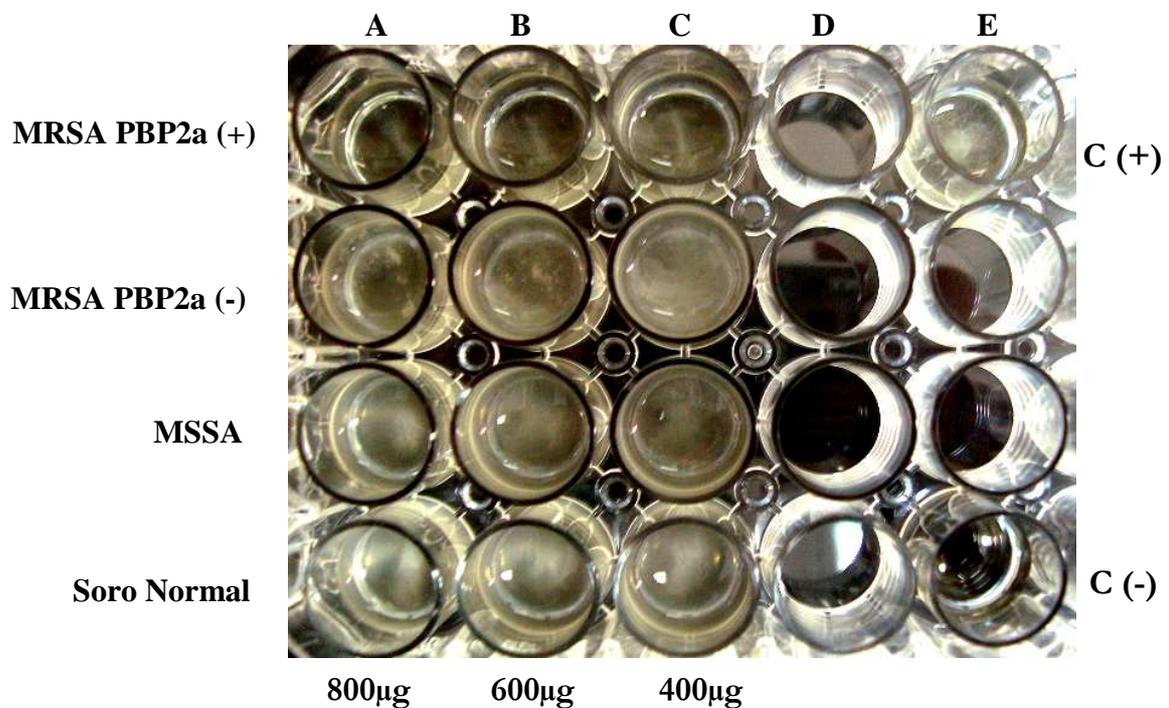


Figura 15: Representação dos resultados de inibição do crescimento bacteriano *in vitro*. Em presença de imunoglobulinas purificadas de soro normal (controle negativo), 1A (800µg), 1B (600µg), 1C (400µg). Imunoglobulinas purificadas de soro de pacientes colonizados por uma cepa MSSA: 2A (800µg), 2B (600µg), 2C (400µg). Imunoglobulinas purificadas de soro de pacientes colonizados por MRSA que não desenvolveram anticorpos anti-PBP2a: 3A (800µg), 3B (600µg), 3C (400µg). Imunoglobulinas purificadas de soro de pacientes colonizados por MRSA e que desenvolveram anticorpo anti-PBP2a: 4A (800µg), 4B (600µg), 4C (400µg). 1E controle positivo (meio de cultura + bactéria) e 4E controle negativo (meio de cultura).

### 3.4.2. Cinética de crescimento de MRSA em presença de Imunoglobulinas purificadas do soro de pacientes colonizados por MRSA.

A Figura 16 mostra a inibição do crescimento bacteriano pelos anticorpos isolados de soro de pacientes colonizados por MRSA e MSSA, em um estudo cinético.

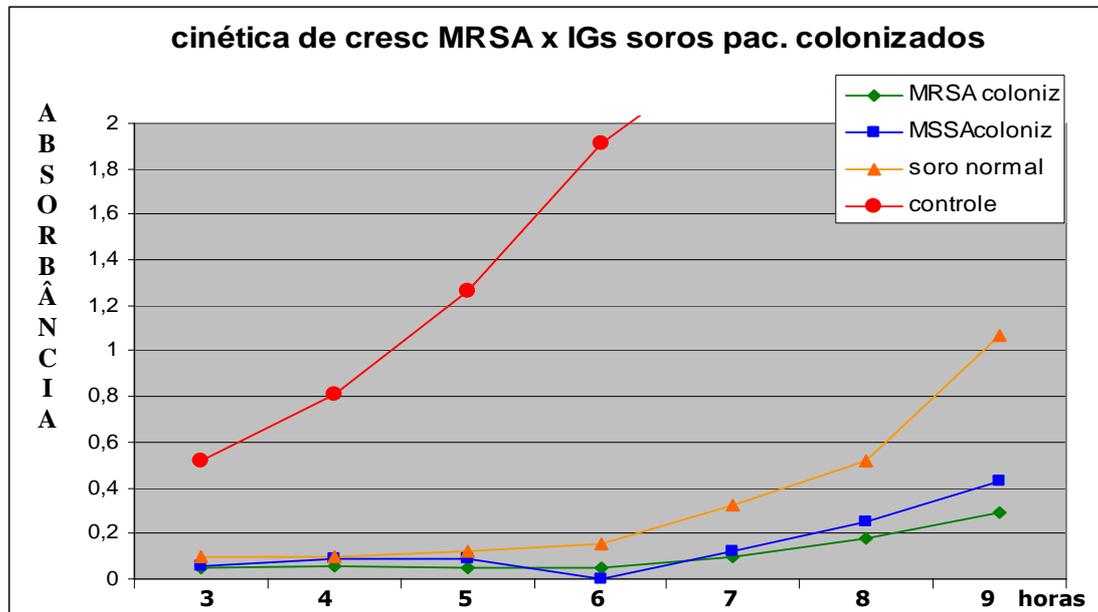


Figura 16: Cinética de crescimento de MRSA x IGs soros de pacientes colonizados. Em vermelho curva de uma amostra sem imunoglobulinas (controle), em laranja curva de uma amostra em presença de imunoglobulinas purificadas de soro normal, em azul curva de uma amostra colonizada por MSSA e em verde curva de uma amostra positiva para anticorpos anti-PBP2a colonizada por MRSA. Estão assinaladas as leituras de absorvância e o tempo de coleta das amostras.

As amostras que receberam anticorpos policlonais purificados anti MRSA, MSSA e soro normal apresentaram uma grande redução no crescimento bacteriano comparadas com o controle. Observou-se também uma redução na curva de crescimento bacteriano nas amostras com soro MRSA e MSSA em comparação com soro normal, principalmente a partir da sexta hora.

Houve uma discreta redução do crescimento bacteriano entre amostras de soro com anticorpos MRSA comparadas com as do soro com anticorpos anti-MSSA (PBP2a negativos), a partir da sétima hora.

### 3.4.3. Curva de crescimento de MRSA em presença de imunoglobulinas purificadas do soro de pacientes colonizados por MRSA (quantificação bacteriana).

Este ensaio foi realizado nas mesmas condições do ensaio anterior sendo avaliada a inibição do crescimento bacteriano em presença de anticorpos isolados de soro de pacientes colonizados por MRSA (positivo para anticorpos anti-PBP2a) e MSSA. Os resultados obtidos das amostras em diferentes fases do crescimento bacteriano, encontram-se na Tabela 7 e Figura 17.

Tabela 7: Resultados da contagem e quantificação bacteriana *versus* poços. Entre parênteses estão indicados os percentuais de redução em relação à coluna da direita.

Horas	Ac anti MRSA	Ac anti MSSA	Ac soro normal	Controle
3	41.000	28.000 (-3,4x)	96.000 (-83x)	8.000.000
4	88.000	91.000 (-2,4x)	220.000 (-95x)	21.000.000
5	120.000	110.000 (-5,5x)	610.000 (-57x)	35.000.000
6	190.000 (-24%)	250.000 (-8x)	2.000.000 (-49x)	98.000.000
7	400.000 (-31%)	580.000 (-15,5x)	8.800.000 (-40x)	350.000.000
8	1.800.000 (-58%)	4.300.000 (-10,5x)	45.000.000	-
9	4.500.000 (-72%)	16.000.000 (-7,5x)	120.000.000	-

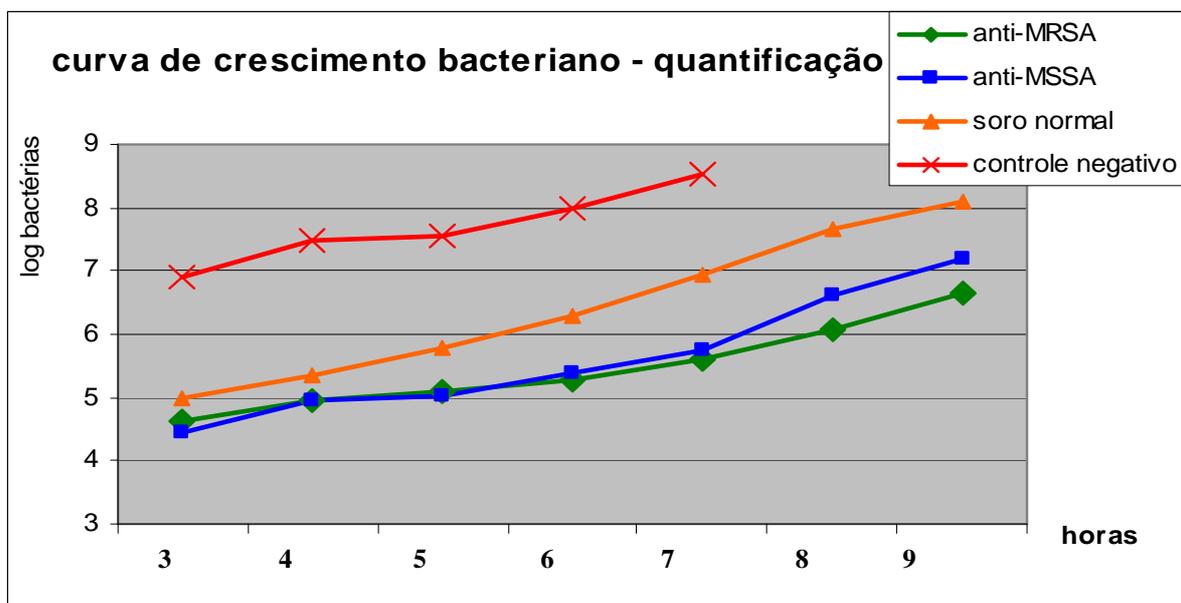


Figura 17: Curva de crescimento bacteriano *versus* tempo. Os pontos da curva indicam o logaritmo (log) do número de bactérias obtidas de acordo com o tempo de incubação.

Na Tabela 7 e Figura 17 podemos observar a redução do número de bactérias, de acordo com a interpretação abaixo:

- A partir da sexta hora, as amostras contendo anticorpo anti-MRSA apresentaram reduções de 24 a 72% na quantidade de bactérias que as amostras contendo anticorpo anti-MSSA. Sendo, 500 vezes menos bactérias que o controle e 8 a 10 vezes menos do que o soro normal, na sexta hora);
- Estas por sua vez apresentaram reduções de 2,4 a 15,5 vezes em relação as amostras contendo anticorpos do soro normal que apresentaram reduções de 40 a 95 vezes quando comparadas com o controle negativo;
- Os anticorpos presentes no soro normal foram capazes de gerar uma redução de 49 vezes na sexta hora, quando comparados com o controle negativo.
- De acordo com o teste estatístico de Kruskal-Wallis (ANOVA) foi verificada uma diferença quase significativa entre o soro normal e as amostras anti-MSSA e anti-MRSA, porém se fosse aumentado o número de amostras provavelmente obteríamos uma maior significância estatística. Um segundo ensaio deverá ser realizado para validar os resultados obtidos.

### **3.5. Teste de sensibilidade a antibióticos das amostras analisadas**

Preliminarmente, não foi possível obter dados de todos os pacientes, os dados da Figura 19, correspondem aos resultados obtidos de 24 pacientes.

Pode-se verificar abaixo uma resistência de 41% dos antibióticos testados nos pacientes e 18% demonstraram 100% sensíveis. Os antibióticos Clindamicina e Eritromicina mostraram 54% de resistência e Levofloxacina mostrou 50% de resistência. A Linezolida, Rifampicina e Vancomicina apresentaram 100% de sensibilidade nas amostras testadas.

Conforme o esperado todos os  $\beta$ -lactâmicos apresentaram 100% de resistência, conforme demonstra a Figura 19.

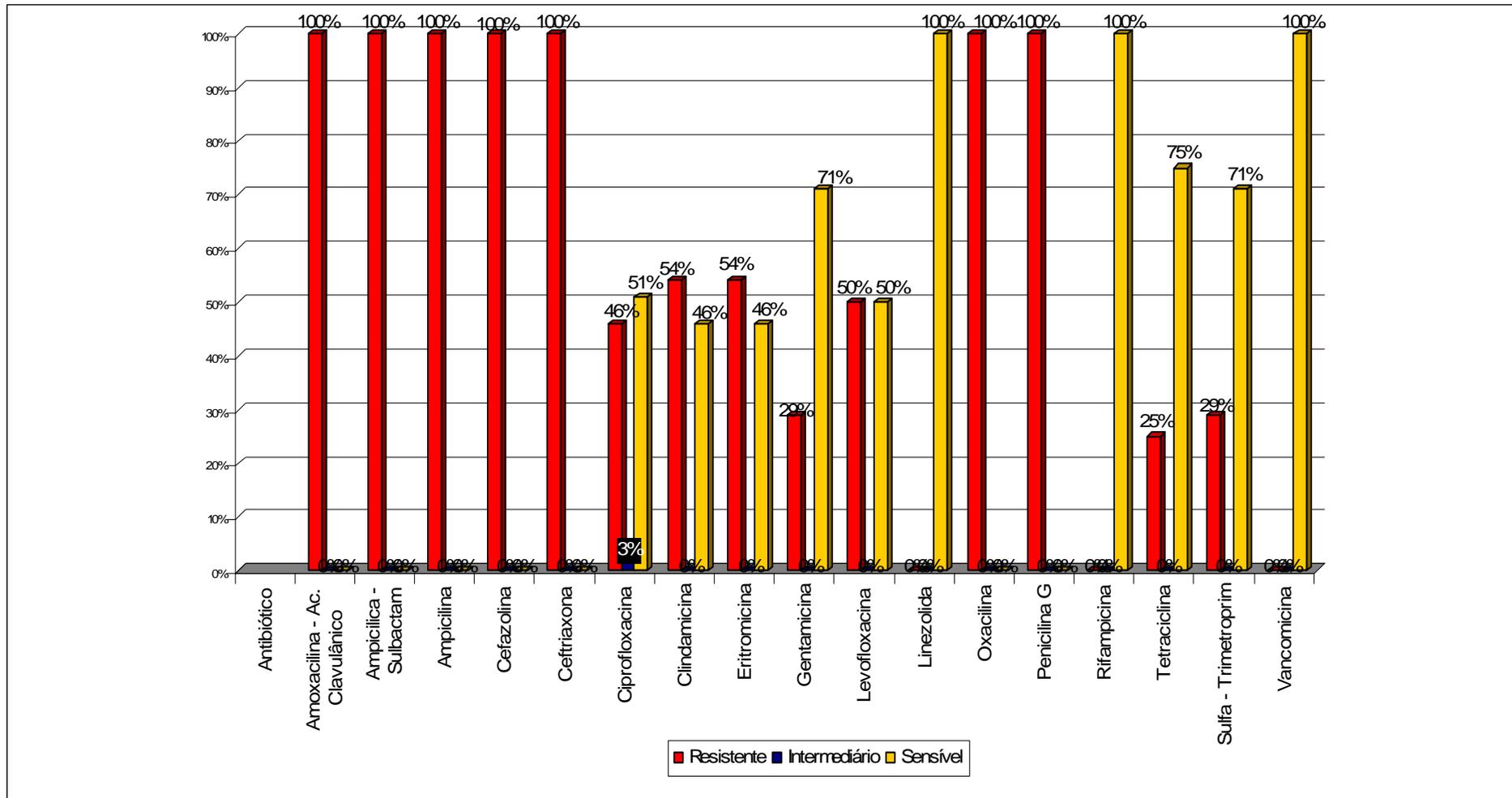


Figura 18: Resistência microbiana das amostras analisadas

#### 4. DISCUSSÃO

Os estafilococos são isolados de pele e mucosas de humanos e animais, colonizando a microbiota normal. Esses microrganismos podem se tornar patogênicos na presença de fatores pré-disponíveis como no uso de sondas, imunossupressão, antibioticoterapia prolongada, *diabetes mellitus*, uso de corticóides, etc. A colonização prévia tem sido considerada um fator de risco para o surgimento de infecções. No caso de cepas multirresistentes (MRSA), a gravidade torna-se maior em função da dificuldade de tratamento e alta morbidade das infecções causadas por este patógeno.

Diante destes fatores mostramos neste estudo uma proporção elevada de portadores colonizados por MRSA, internados no Hospital do Amparo no Rio de Janeiro, o que é preocupante, visto que profissionais da saúde e pacientes podem representar uma importante fonte de disseminação deste microorganismo (Senna, 2003). Durante todo o estudo, uma proporção significativa dos pacientes portadores de MRSA foi detectada na primeira coleta realizada (52%), incorrendo na possibilidade dos pacientes terem se colonizado antes mesmo de terem sido hospitalizados, a partir da comunidade ou de internações prévias, o que contribui na dificuldade de controlar a transmissão hospitalar de MRSA no hospital, principalmente. O objetivo inicial deste estudo era analisar amostras de pacientes infectados e colonizados por MRSA, porém obtivemos uma proporção acentuada de pacientes colonizados em sua maioria, o que direcionou nosso estudo para pacientes colonizados, que possuem características epidemiológicas e imunológicas diferentes dos pacientes infectados.

Dentre os 40 pacientes, que puderam ter suas fichas clínicas analisadas, foi verificado que 75% estavam na faixa etária acima de 66 anos, sendo, então, sugestivo que pacientes com faixa etária mais elevada são mais propícios a serem colonizados e/ou infectados por MRSA. Cavalcanti e colaboradores (2006) sugerem a redução do número de portadores com o aumento da idade, todavia no presente estudo não foi possível inserir amostras de pacientes com faixa etária reduzida. Lucet e colaboradores (2003) demonstraram que 73% dos pacientes apresentavam idade maior de 60 anos, fato fortemente associado com a característica do paciente portador de MRSA, independentemente de outros fatores associados, concordando

com os resultados obtidos deste estudo. O motivo da internação, clínica ou cirúrgico, não atuou como fator associado à colonização por *S. aureus*, nem a MRSA, concordando com os resultados de Lucet e colaboradores (2003).

De acordo com Cavalcanti *et al.* (2006), o estado de portador de *S. aureus* e MRSA é fator de risco para o desenvolvimento de infecções durante o internamento em UTI, aumentando a mortalidade desses pacientes. Conforme observado neste estudo, onde 25% dos pacientes que foram analisados foram a óbito por complicações diversas, infectados por MRSA.

Segundo Dryla *et al* (2005) , *S. aureus* é um patógeno oportunista e, como tal, pode ser encontrado em grande parte da comunidade sem causar doenças graves. Um quarto dos indivíduos a longo prazo são portadores nasais de *S. aureus*. O reconhecimento do patógeno pelo sistema imunológico, avaliado pelas respostas dos anticorpos, pode variar entre diferentes indivíduos da população humana. A este respeito, o nosso estudo mostrou que os indivíduos saudáveis podem ter níveis de anticorpos circulantes anti-estafilococos em grau variável, provavelmente em virtude do contato prévio com o patógeno, dificultando assim termos uma amostra controle de “soro normal”, ou seja, um soro que não contenha anticorpos anti-estafilococos. Lorenz e colaboradores (2000) detectaram variações no padrão de resposta de anticorpos em diferentes indivíduos saudáveis podendo ser devido à diferenciação entre as cepas de *Staphylococcus aureus*. Contudo, a presença de anticorpos nativos circulantes em todos os indivíduos de uma população normal não necessariamente fornece uma forte proteção contra a infecção, uma vez que os doentes no início da sepse também apresentaram uma resposta imunológica comparável à observada em indivíduos saudáveis. Neste caso, a não ocorrência de anticorpos, mas sim o primeiro título de anticorpo não influenciaria no curso da sepse, podendo ocorrer uma resposta mais fraca de anticorpos a alguns isolados em comparação aos indivíduos saudáveis.

Em relação à produção de anticorpos anti-estafilococos e MRSA, nossos resultados corroboram os descritos por Lorenz *et al.* (2000), onde pudemos observar a presença destes anticorpos em praticamente todas as amostras analisadas. Em relação aos anticorpos anti-PBP2a, observamos que uma grande parcela de pacientes colonizados apresentaram estes anticorpos.

Entretanto, na interpretação destes resultados deve-se levar em consideração o grau de infecção/colonização (carga bacteriana), estado imunológico do paciente, o tempo de internação, o grau de virulência da cepa bacteriana entre outros, uma vez que estes fatores podem influenciar na evolução do quadro clínico de cada caso, levando assim a interpretações diferenciadas de paciente para paciente. Sendo assim, torna-se importante avaliar em

diferentes etapas da colonização/infecção o nível de anticorpos presentes, como também a persistência da bactéria no indivíduo de forma mais abrangente e específica, para, então, determinar de forma mais precisa o nível de proteção individual e em que momento isto pode ocorrer.

Em nosso estudo, observamos que aproximadamente 40% dos indivíduos internados na UTI e que obtiveram alta hospitalar com atendimento domiciliar, retornaram ao hospital com queixas diversas e ainda apresentavam colonização por MRSA e, na maioria das vezes a mortalidade ocorreu, verificando que a continuidade do tratamento pós-alta tem grande importância no quadro clínico do paciente. É importante ressaltar que, nestes casos de pacientes colonizados por MRSA (4 pacientes) que foram a óbito, somente 1 deles apresentou anticorpos anti-PBP2a pelos imunoenaios realizados.

O retorno do paciente portador para seu ambiente doméstico pode propiciar a disseminação da bactéria entre familiares e até mesmo para animais domésticos, conforme sugerido por Weese *et al.* (2006). Por isso, torna-se ainda mais importante o controle de pacientes ainda colonizados com alta hospitalar, e, conforme a análise das fichas clínicas, em alguns casos não foi evidenciada a presença de alta com atendimento domiciliar, sugerindo que tanto os humanos como os animais domésticos devem ser avaliados para a limitação do impacto de MRSA em ambas as populações, inclusive, os profissionais de saúde como demonstrado pelo estudo de De Carvalho *et al.* (2009), onde a prevalência de colonização por MRSA entre eles foi de 47,6% (162/340).

Os testes de imunoensaio (ELISA e Western blot) foram capazes de identificar a presença de anticorpos anti-PBP2a em grande parte das amostras analisadas. O grau de resposta imunológica observada variou entre as amostras, provavelmente em virtude dos fatores anteriormente descritos. Os testes foram empregados de forma complementar, uma vez que um deles apresenta maior sensibilidade (ELISA) e outro, maior especificidade Western blot.

Uma vez que observamos a presença de anticorpos, tentamos investigar se estes anticorpos seriam capazes de fornecer uma atividade protetora ou não, capaz de promover um bloqueio na multiplicação bacteriana. Um aspecto fundamental a ser considerado é a concentração de anticorpos anti-PBP2a no soro dos pacientes (positivos). Estes soros policlonais também possuem anticorpos contra diversos outros antígenos além da PBP2a.

O método de referência para avaliação de proteção conferida por uma determinada droga contra um patógeno bacteriano *in vitro* é a determinação da concentração inibitória mínima (NCCLS, 2002).

Entretanto, em nosso caso, foi necessário fazer uma adaptação de método reduzindo o inóculo bacteriano em 10 vezes (10.000 bactérias). Em nosso ensaio de proteção *in vitro*, pudemos observar uma leve redução da turbidez nas amostras na presença das imunoglobulinas purificadas contendo anticorpos anti-PBP2a, sugerindo haver um grau de proteção ainda que muito baixo para as condições empregadas.

Desta forma, para melhor investigar a existência de proteção ou não, realizamos um estudo cinético, com quantificação bacteriana com o decorrer do tempo de incubação. Assim, foi observada considerável redução do crescimento bacteriano a partir da terceira hora até a nona hora de incubação, quando comparadas ao controle negativo. Obtivemos uma queda de 72% na quantificação bacteriana da amostra contendo anticorpo anti-MRSA, conforme evidenciado pelos imunoenaios. Entretanto, é importante observar a redução do crescimento bacteriano nas amostras tratadas com imunoglobulinas extraídas de soro normal e do soro de pacientes colonizados por cepas MSSA (PBP2a negativas). Esta redução do crescimento bacteriano denota a presença de outros anticorpos com atividade antibacteriana.

No caso do soro normal, provavelmente existam anticorpos anti-*Staphylococcus*, em concentrações menores do que as observadas nas fases iniciais de uma infecção em paciente imunocompetente, uma vez que esta bactéria pode fazer parte da flora normal.

Em relação à proteção observada nas amostras tratadas com as imunoglobulinas de pacientes colonizados por MSSA, é provável que exista uma maior quantidade destes anticorpos, em especial contra proteínas de superfície. Assim, podemos supor que a pequena diferença observada na proteção vista nas amostras tratadas com imunoglobulinas de pacientes colonizados por MRSA deva-se a presença de anticorpos anti-PBP2a.

A confirmação de proteção conferida por anticorpos anti-PBP2a presente em soro de pacientes colonizados por MRSA, poderia ser realizada pelo isolamento e purificação destes anticorpos utilizando métodos cromatográficos (imunocromatografia com imobilização da PBP2a recombinante). Entretanto, a realização de um trabalho desta natureza seria dispendioso e demorado, não sendo possível a realização do mesmo no prazo previsto para esta dissertação de mestrado. Além disso, seria necessário um grande volume de soro positivo para obtermos concentrações significativas de anticorpo anti-PBP2a purificado.

## 5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na presente investigação podemos concluir que:

- 1) Pacientes colonizados por MRSA são capazes de produzir anticorpos anti-PBP2a.
- 2) Esses anticorpos apresentaram ação protetora conforme demonstrado nos ensaios *in vitro*.
- 3) A descolonização de pacientes antes da alta hospitalar tem grande influência na transmissibilidade do patógeno entre profissionais de saúde, pacientes e familiares.
- 4) Em virtude da baixa concentração destes anticorpos, a proteção conferida foi pequena.
- 5) Estes resultados dão embasamento e indicação para o desenvolvimento de uma vacina anti-PBP2a para a prevenção de infecções causadas por MRSA, como também para o emprego de imunoterapia passiva para o tratamento de pacientes infectados por este patógeno.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaral M.M., Coelho L.R., Flores R.P., Souza R.R., Silva-Carvalho M. C., Teixeira L. A., and A; M.S. Figueredo. **The predominant variant of the Brazilian Epidemic Clonal complex of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has an enhanced ability to produce biofilm and to adhere to and invade airway epithelial cells.** Journal of Infectious Diseases. V. 192, p. 801-10. 2005.

Andremont A. Tibon-Cornillot M.. Le triomphe des bacteries. 2007 1 ed. Max Milo.

Appelbaum, P. C. - **MRSA—the tip of the iceberg** - Clin Microbiol Infect 2006; 12 (Suppl. 2): 3–10

Astagneau, P.; Fleury, L.; Leroy, S.; Lucet, J-C.; Golliot, F.; Régnier, B.; Brücker, G. **Cost of antimicrobial treatment for nosocomial infections based on a French prevalence survey.** Journal of Hospital Infection, v.42, p. 303-312, 1999.

Baird-Parker, A. C. **The Staphylococci: an introduction.** Journal for Applied Bacteriology Symposium Supplement, New York, p. 1S-8S, 1990.

Bebbington, C. and Geoffrey, Y. **Antibodies for the treatment of bacterial infections: current experience and future prospects** Current Opinion in Biotechnology 2008, 19:613–619

Beretta, ALRZ; Trabasso P; Stucchi RB; Moretti ML. **Use of molecular epidemiology to monitor the nosocomial dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in**

**an University Hospital from 1991 to 2001.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. V.37, p. 1345-51. 2004.

Benoit, Janzon Stephen R, Concepción Estivariz, Cristina Mogdasy, Walter Pedreira, Antonio Galiana, Alvaro Galiana, Homero Bagnulo, Rachel Gorwitz, Gregory E. Fosheim, Linda K. McDougal, and Daniel Jernigan. **Community Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* as Potential Cause of Healthcare-associated Infections, Uruguay, 2002–2004.** Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 14, No. 8, August 2008

Bobin-Dubreux S, Reverdy M-E, Nervi C, Rougier M, Bolmström A, Vandenesch F et al. **Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative.** Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(1):349-352).

BRASIL – Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, DGPE, **Coordenação de Controle de infecção Hospitalar.** Ofício n. 044, Brasília, 26 de abril de 1999.

Chang, S, Dawn M. Sievert, Jeffrey C. Hageman, Matthew L. Boulton, M.D., Fred C. Tenover, Ph.D., M.P.H., Frances Pouch Downes, Dr.P.H., Sandip Shah, M.S., James T. Rudrik, Guy R. Pupp, William J. Brown, Denise Cardo, Scott K. Fridkin; **Infection with Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Containing the vanA Resistance Gene.** - n engl j med 348;14 www.nejm.org april 3, 2003.

Cosgrove SE; Carroll KC; Perl TM. ***Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin.** Clin Infect Dis. ;39(4):539-45. 2004.

Dall’Antonia M., Coen PG., Wilks M et al.,. **Competition between methicillin-sensitive and resistant *S. aureus* in the anterior nares.** J Hospital Infection, v. 61,62-67. 2005.

David K. Henderson, MD Managing Methicillin-Resistant Staphylococci: **A Paradigm for Preventing Nosocomial Transmission of Resistant Organisms.** The American Journal of Medicine Vol 119 (6A), S45–S52 – 2006

DeLeo, FR; BinhAnDiep, Otto M. - **Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections** - Infect Dis Clin N Am 23 (2009) 17–34

Devine J , Cooke RP, Wright EP. **Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) contamination of ward-based computer terminals a surrogate marker for nosocomial MRSA transmission and handwashing.**

Deurenberg R. H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A. W., Bruggeman C. A., Stobberingh E. E. **The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI, 13, 222–235; 2006.

Drago L, Nicola L, De Vecchi E. **A comparative in-vitro evaluation of resistance selection after exposure to teicoplanin, vancomycin, linezolid and quinupristin-dalfopristin in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp.** Clin Microbiol Infect. 2008 Jun;14(6):608-11.

Emori, T.G., Gaynes, R.P. **An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory.** Clinical Microbiology Reviews, v.6(4), p.428-442, 1993

Enright MC, Robinson DA, Randle G et al. **The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).** Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 7687–7692.

Foster, T. J., and M. Höök.. **Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*.** Trends Microbiol. 6:484–488; 1998.

Gaynes, R. P. **Surveillance of nosocomial infections: A fundamental ingredient for quality.** Infection Control and Hospital Epidemiology, v.18(7), p. 475-478. 1997.

Goggin C., Ghuysen J.M., **Multimodular penicillin-binding proteins: An enigmatic family of orthologs and paralogs.** Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 10, p. 1079-93. 1998.

Gonzalez-Zorn, B, Senna, JPM, Fiette L., Shorte S., Testard A., Chignard M., Courvalin P. and Grillot-Courvalin C. **Bacterial and host factors implicated in nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in mice.** Infection and Immunity (2005) 73:1847-51.

Graham P., Lin S, Larson, E. “ **A U.S. population-based survey of *Staphylococcus aureus* colonization**”. *Ann Intern Med* 144 (5): 318-25. PMID 16520472; 2006.

Hardman, A. M.; Stewart, G. S. A. B. & Williams, P. ‘**Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria**’, in Antonie van Leeuwenhoek, v. 74, p. 199, 1998.

Heiman F.L Wertheim, Damian C Melles, Margreet C Vos, Williem van Leeuwen, Alex van Belkum et al.,. **The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections**. *Lancet Infect Dis* ; 5 : 751-62 ; 2005

Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. & Ito, T. **The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. *Trends Microbiol.* **9**, 486–493 ; 2001

Holt, J. G. *et al.* **Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology. 9. ed.** Baltimore: Williams e Wilkins, 1994. 787 p.

Hsueh PR, Teng LJ, Chen WH et al. **Increasing prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan from 1986 to 2001**. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1361–1364.

Ing MB, Baddour LM, Bayer AS. **Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications**. In: Crossley KB, ArcherGL, eds. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone, 331-54.; 1997.

Jevons, M. P. (1961) "**Celbenin**" - resistant *Staphylococci* *Br. Med. J.* **1**, 124–125.

Jones, K. *et al.* **Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression**. *J Dermatol Sci*, v. 42, p. 203-14, 2006.

Jones ME, Karlowsky JA, Draghi DC, Thornsberry C, Sahn DF, Nathwani D. **Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy**. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 406–419.

Keller, L & Surette, Michael G.- **Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective.** Nature Reviews | Microbiology - Volume 4 | April 2006.

Kim HB, Jang HC, Nam HJ et al. **In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide survey.** Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1124–1127.

Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB, Fridkin SK. **Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigators. “ Invasive Methicillin – Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States “** JAMA. Retrived on 2007.

Kluytmans, J., Alex Van Belkum e Henri Verbrugh; **Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks.** CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, 0893-8512/97/\$04.0010 July 1997, p. 505–520 Vol. 10, No. 3.

Kohner, P. et al. **Comparison of susceptibility testing methods with mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp.** J Clin Microbiol, v. 37, p. 2952- 61, 1999.

Koneman, F. W. *et al.* **Cocos Gram-Positivos: Parte I: Estafilococos e Microrganismos Relacionados.** Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p., p. 551-588.

Kopp BJ.; Nix D.E., Armstrong E.P. **Clinical and economic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections.** The Annals of Pharmacotherapy; v.38, p. 1377-82. 2004.

Lim, D & Strynadka, Natalie C.J.. **Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Nature Structural Biology **9**, 870 - 876 (2002).

Lowy FD, Fant J, Higgins LL, Ogawa SK, Hatcher VB. ***Staphylococcus aureus* — human endothelial cell interactions.** J Ultrastruct Mol Struct Res; 98:137-46; 1988.

Lowy, Franklin D. ***Staphylococcus aureus* Infections.** The New England Journal Of Medicine, Volume 339 Number 8. August 20, 1998

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. **Brock biology of microorganisms.** 10<sup>o</sup> ed. New Jersey: Prentice Hall; 2004..

Marlowe, E.M. et al. **Practical strategies for detecting and confirming vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*: a tertiary-care hospital laboratory's experience.** J Clin Microbiol, v. 39, p. 2637-9, 2001.

Marraffini, L.A. , Andrea C. DeDent, and Olaf Schneewind - **Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria** Microbiology And Molecular Biology Reviews, Mar. 2006, p. 192–221 Vol. 70, No. 1 1092-2172/06/\$08.00\_0 doi:10.1128/MMBR.70.1.192–221.200; 2006

McNamara, P.J., Milligan-Monroe, K.C., Khalili, S., and Proctor, R.A. **Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*.** J. Bacteriol. 182, 3197–3203 ; 2000.

Mímica, M.J.& Mendes, C.M.F - **Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em - J Bras Patol Med Lab • v. 43 • n. 6 • p. 399-406 • dezembro 2007**

Moreira, M., Medeiros, E.A.S Pignatari, A.C.C. S.B. Wey, D.M. Cardo. **Efeito da infecção hospitalar da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina sobre a letalidade e o tempo de hospitalização.** Rev. Assoc. Med. Bras. v.44 n.4 São Paulo out./dez. 1998.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. TaxBrowser, Washington, 12 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>>. Acesso em: 16 jan. 2009.

O'Brien, F.G.; Pearman, J.W.; Gracey, M.; Riley, T.V.; Grubb, W.B.. **Community strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* involved in a hospital outbreak.** Journal of Clinical Microbiology. v.37(9), p.2858-2862, 1999.

Ohwada, A., Mitsuaki Sekiya, Hideaki Hanaki, Kyoko Kuwahara Arai, Isao Nagaoka, Satoshi Hori, Shigeru Tominaga, Keiichi Hiramatsu and Yoshinosuke Fukuchi - **DNA vaccination by *mecA* sequence evokes an antibacterial immune response against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*** - *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1999) **44**, 767-774

Pannuti, C.S.; Grinbaum, R.S. **An overview of nosocomial infection control in Brazil.** Infection Control and Hospital Epidemiology, v.16(3), p.170-174, 1995.

Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. **MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues.** Ann Rev Microbiol 48:585-617.; 1994.

Peacock, S.J., de Silva, I and Lowry, FD. **What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus* ?** Trends Microbiol. 2001. 9: 605-610

Pfaller, M.A.; Jones, R.N.; Doern, G.V.; Kugler, K.; and The Sentry Participants Group. **Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: Frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997).** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.42(7), p.1762-1770, 1998.

Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. **Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*.** Clin Infect Dis;20:95-102; 1995.

Ravel, R. **Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos Dados Laboratoriais.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 162-163.

Remonatto, G., Cássia M. Cardoso, Cristiani G. de Marques, Ane Elise B. da Silva, Luciane C. Gelatti, Cláudia F. M. Leite. **CA-MRSA: um patógeno emergente.** NewsLab - edição 80 – 2007.

Resende, E.M.; Couto, B.R.G.M.; Starling, C.E.F.; Módena, C.M. **Prevalence of nosocomial infections in general hospitals in Belo Horizonte.** Infection Control and Hospital Epidemiology, v.19(11), p.872-876, 1998.

Rodríguez C.A., Vesga O.; ***Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina;** Biomédica 2005;25:575-87

Romby, P., Vandenesch, F., and Wagner, E.G. **The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression.** Curr. Opin. Microbiol. 9, 229–236; 2006.

Ryffel C., Kayser F.H., Berger-Bachi. B. **Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in *staphylococci*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. V.36, p. 25-31. 1992.

Santos AL., Dilvani Oliveira Santos, Cícero Carlos de Freitas, Bruno Leal Alves Ferreira, Ilídio F. Afonso, Carlos Rangel Rodrigues, Helena C. Castro; ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar.** J Bras Patol Med Lab • v. 43 • n. 6 • p. 413-423 • dezembro 2007.

Schaffer, A.C.& Lee, J.C. – **Staphylococcal vaccines and immunotherapies** - Dis Clin N Am 23 (2009) 153–171.

Schaffer, A.C.; Robert M. Solinga, Jordan Cocchiaro, Marta Portoles, Kevin B. Kiser, Allison Riskey, Suzanne M. Randall, Viviana Valtulina, Pietro Speziale, Evelyn Walsh, Timothy Foster, and Jean C. Lee - **Immunization with *Staphylococcus aureus* Clumping Factor B, a Major Determinant in Nasal Carriage, Reduces Nasal Colonization in a Murine Model - Infection and Immunity,** April 2006, p. 2145-2153, Vol. 74, No. 4

Science Photo Library. *Staphylococcus aureus* bacteria,. Disponível em:

<<http://www.sciencephoto.com/images/imagePopUpDetails.html?pop=1&id=662340142&pvviewid=&country=67&search=staphylococcus&matchtype=FUZZY>>. Acesso em: 16 Jan. 2009.

Senna JP, Pinto CA, Bernardon DR, Francisco AG, Epztein E, Ritt CB, Oppermann C, Santos DS. **Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among care-workers and patients in an emergency hospital.** J Hospital Infection Jun;54(2):167, 2003.

Senna, JP; Goussard, S.; Grillot-Courvalin, C.; **Mucosal immunisation against PBP2a reduces MRSA nasal colonisation in mice.** Vaccine Congress 2008 (Awarded with the Edward Jenner Prize).

Senna JP, Roth DM, Oliveira JS, Machado DC, Santos DS- **Protective immune response against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in a murine model using a DNA vaccine approach** - Vaccine 21 (2003) 2661–2666

Stapleton, P.D.& Taylor, P.W., **Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* mechanisms and modulation.** Science Progress, 85 (1), 57–72, 2002.

Stranger-Jones, Yukiko K. Taeok Bae, and Olaf Schneewind - **Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*** - 16942–16947 \_ PNAS \_ November 7, 2006 \_ vol. 103 \_ no. 45 [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606863103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0606863103)

Tavares, W.; **Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33(3):281-301, mai-jun, 2000.

Teixeira L.A.; C.A. Resende, L.R. Ormonde, R. Rosenbaum, M.S. Figueiredo, H. de Alencastre and A. Tomasz. 1995. **Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus aureus* clone in Brazil.** Journal of Clinical Microbiology., v.33, p.2400-04, 1995.

Tenover F.C.; Lancaster, M.V.; Hill, B.C.; Stedward, C.D.; Stocker, S.A.; Hancock, G.A.; O'Hara, C.M.; Clark, N.C.; Hiramatsu, K.. **Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides.** Journal of Clinical Microbiology, v.36(4), p.1020-1027, 1998.

Tenover FC. **Implications of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*.** J Hosp Infect 1999; 43 (Suppl 1):S3-S7.

Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. **Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus***. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(2):327-332.

Tiemersma EW, Bronzwaer SLAM, *et. al.* **Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002**. *Emerging Infectious Diseases.*, v.10, p.1627-34, 2004.

Toledo-Arana, A., Repoila, F., and Cossart, P. (2007). **Small noncoding RNAs controlling pathogenesis**. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 182–188; 2007.

Trabulsi LM e Alterthum F; *Microbiologia 4º Edição* editora Atheneu, 2004.

Van Belkum, A. **Staphylococcal colonization and infection:homeostasis versus disbalance of human (innate) immunity and bacterial virulence**. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v.19:330-344, 2006.

Vandenesch, F., Naimi T., Enright M.C., Lina G., Nimmo G. R., Heffernan H., Liassine N; Bes M., Greenland T., Reverdy M. E., and Etienne J. **Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence**. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, p. 978-84. 2003.

Vastag, Brian; **New Vaccine Decreases Rate of Nosocomial Infections**, Vol. 285 No. 12, March 28, 2001

Velasco, D. *et al.* **Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus***. *J Antimicrob Chemother*, v. 55, p. 379-82, 2005.

Velázquez-Meza, M. E. ***Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination**. *Salud Pública de México*, v. 47, p. 381-7, 2005.

Vesga O, Groeschel MC, Otten MF, Brar DW, Vann JM, Proctor RA. ***Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu**. *J Infect Dis*;173:739-42; 1996.

Wagner, M.B.; Da Silva, N.B.; Vinciprova, A.R.; Becker, A.B.; Burtet, L.M.; Hall, A.J.

**Hospital-acquired infections among surgical patients in a Brazilian hospital.** *Journal of Hospital Infection*, v.35, p.277-285, 1997.

Walsh TR, Bolmström A, Qwörnström A, Ho P, Wootton M, Howe RA et al. **Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides.** *J Clin Microbiol* 2001; 39(7):2439-2444.

Wang, R., Braughton, K.R., Kretschmer, D., Bach, T.H., Queck, S.Y., Li, M., Kennedy, A.D., Dorward, D.W., Klebanoff, S.J., Peschel, A., et al. **Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA.** *Med.* 13, 1510–1514; 2007.

Weese, J.S., H. Dick, B.M. Willey, A. McGeer, B.N. Kreiswirth, B. Innis, D.E. Low - **Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household** - *Veterinary Microbiology* 115 (2006) 148–155.

Weigel, L.M. et.al. **Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*.** *Science* 302. 1569-1571 (2003).

Wertheim HFL, Melles DC, Vos MC, *et al.*,. **The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections.** *Lancet Infect Dis.* 5:751-762, 2005.

Wertheim HFL, Vos MC, Ott A *et al.*,. **Risk of outcome of nosocomial *S.aureus* bacteraemia in nasal carriers versus non carriers.** *Lancet* , v.364:703 -705, 2004.

Weinstein, M.P.; Towns, M.L.; Quartney, S.M.; Mirret,S.; Reimer, L.G.; Parmigiani, G.; Reller, L.B. **The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of microbiology, epidemiology and outcome of bacteremia and fungemia in adults.** *Clinical Infectious Diseases*, v.24, p.584-602, 1997.

‘ M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. **A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital.** *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:399-403.

Wu T, Yeaman MR, Bayer AS. **In vitro resistance to platelet microbicidal protein correlates with endocarditis source among bacteremic staphylococcal and streptococcal isolates.** Antimicrob Agents Chemother ; 38:729-32 ; 1994.

Zecconi, A.; Hahn, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. Bulletin of the International Dairy Federation, Bruxelles, v. 345, p.15-18, 2000.

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar\\_visavrsa\\_FAQ.html#2](http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar_visavrsa_FAQ.html#2) Acessado em 21/01/2009

<http://www.abev.com.br/controldeinfeccao/palestras/8h30-denisemarangoni-control.pdf>

Acessado em 02/02/2009

## 7. ANEXOS



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



**Comitê de Ética em Pesquisa**

### PARECER CONSUBSTANCIADO – 022/208

Protocolo 0009.0.009.000-08

#### 1. Identificação:

**Título do Projeto:** “Pesquisa de anticorpos Anti-PBP2a em pacientes colonizados ou infectados por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)”.

**Pesquisador Responsável:** José Procópio Senna (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

**Mestrando:** Rodrigo Muller (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

**Instituição Responsável:** Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz).

**Data de Apresentação ao CEP:** 26/02/2008.

#### 2. Sumário:

O presente projeto tem por objetivo geral analisar amostras de soro de pacientes colonizados e infectados por MRSA e proceder à identificação de anticorpos anti-PBP2a. Os resultados obtidos nos permitirão ter uma melhor compreensão da resposta imune na evolução das infecções por MRSA e avaliar o potencial deste alvo para o desenvolvimento de estratégias baseadas em imunoterapia. As amostras de soro de pacientes colonizados ou infectados por MRSA estão sendo obtidos de pacientes do Hospital do Amparo do Rio de Janeiro. Serão incluídos soros controle de pacientes infectados por *S.aureus* sensíveis à meticilina (cepas não produtoras de PBP2a) e de pacientes hígidos (não infectados ou colonizados por MRSA). Os pacientes considerados colonizados são aqueles que em um determinado momento (o da coleta de sangue) são portadores de MRSA em algum sítio externo do corpo (cavidade nasal, perineo, axilas) sem desenvolver um quadro infeccioso. Os pacientes considerados como infectados são aqueles que apresentam um quadro clínico de infecção como isolamento do patógeno. Foi elaborado um questionário contendo informações relevantes sobre cada caso.

#### 3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Em substituição ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado um Termo de Compromisso, onde o pesquisador responsável compromete-se a manter a confidencialidade, assim como a privacidade dos participantes do projeto. Todo o material necessário para realização deste estudo (reagentes e equipamentos) está previsto em Bio-Manguinhos; as técnicas que serão utilizadas são padronizadas e executadas rotineiramente naquela Unidade.

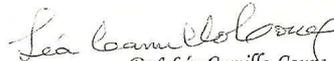
#### 4. Diligências:

Sim. Foram satisfeitas.

#### 5. Parecer: APROVADO.

Data: 17 de setembro de 2008.

Assinatura do Coordenador:

  
 Dr.ª Léa Camillo-Coura  
 Coordenadora do Comitê  
 de Ética em Pesquisa  
 IPEC / FIOCRUZ