

Detecção de genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} relacionados às enzimas β -lactamases em amostras de hemocultura empregando a técnica de amplificação isotérmica de DNA (LAMP)

Priscila Batista Tavares¹
 Uly Crisla Ferreira Alves¹
 Wanderson da Silva Botelho¹
 Jhêssica Nayara Pereira Dias¹
 Mariany Freitas da Vitória¹
 Andrea de Souza Monteiro²
 Rafael Silva Gama³

¹Acadêmicos do Curso de Farmácia da Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

²Universidade Ceuma
 São Luís, Maranhão, Brasil

³Orientador e Coordenador do Curso de Farmácia da Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil

Resumo

O aumento da prevalência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos é um dos problemas mais graves que atingem os serviços de saúde. Um método de detecção de bactérias produtoras de ESBL é necessário para identificação e controle da disseminação de micro-organismos multidroga resistentes. Neste estudo objetivou-se a detecção dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} relacionados a enzimas β -lactamases em amostras de hemocultura de um hospital de Governador Valadares, Minas Gerais, empregando duas técnicas moleculares, LAMP e mPCR, bem como comparar a eficiência de detecção de ambos os métodos. Das 108 linhagens bacterianas (Gram-positivas e Gram-negativas) foram selecionadas 20 Gram-negativas que apresentaram maior perfil de resistência aos antimicrobianos testados pelo método Kirby- Bauer. Foram extraídos o DNA das 20 hemoculturas selecionadas, e posteriormente realizou-se os ensaios de LAMP e mPCR para pesquisa dos genes de interesse. Destas, 15 linhagens foram resistentes à pelo menos 3 classes de antimicrobianos e em todas as linhagens de bactérias testadas, os resultados de detecção dos genes foram semelhantes em ambas as técnicas, com exceção de uma amostra de *Klebsiella ozanae*, cujo gene *bla*_{SHV} foi detectado apenas pela técnica de LAMP. A técnica de LAMP demonstrou-se mais eficiente por ser realizada em menor tempo, não necessitar de equipamentos sofisticados, além da fácil interpretação dos seus resultados.

Palavras-chave: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), mPCR, ESBLs, Genes de resistência *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}.

Abstract

The increased prevalence of antimicrobial resistant micro-organisms is one of the most serious problems affecting health services. A method of detecting ESBL foodborne bacteria is required for the identification and control of dissemination of multidrug resistant microorganisms. This study aimed to detect *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes related to β -lactamases enzymes in blood culture samples from a hospital in Governador Valadares, Minas Gerais, employing two molecular techniques, LAMP and mPCR, as well as to compare the efficiency of detection of both methods. Of the 108 bacterial strains (Gram-positive and Gram-negative), 20 Gram-negative strains that presented a higher profile of resistance to antimicrobials tested by the Kirby-Bauer method were selected. DNA was extracted from the 20 selected blood cultures, and subsequently the LAMP and mPCR assays were performed to search for the genes of interest. Of these, 15 strains were resistant to at least 3 classes of antimicrobials and in all the bacterial strains tested, the results of gene detection were similar in both techniques, with the exception of one sample of *Klebsiella ozanae*, whose *bla*_{SHV} gene was detected only by the LAMP technique. The LAMP technique proved to be more efficient as it was performed in less time, did not require sophisticated equipment, and had easy interpretation of its results.

dor Valadares, Minas Gerais, using two molecular techniques, LAMP and mPCR, as well as to purchase a detection efficiency of both The methods. Of the 108 bacterial strains (Gram-positive and Gram-negative), 20 Gram-negative strains were selected that showed a higher antimicrobial resistance profile tested by the Kirby-Bauer method. DNA was extracted from the 20 selected blood cultures, and later the LAMP and mPCR assays were performed to search for the genes of interest. Of these, 15 strains were resistant to at least 3 antimicrobial classes and in all bacterial strains tested, the results of the detection of the genes were analyzed in both techniques, except for a sample of *Klebsiella ozanae*, whose *blaSHV* gene was only detected By the technique of LAMP. The LAMP technique proved to be more efficient because it was performed in a shorter time, did not require sophisticated equipment, and an easy interpretation of its results.

Key words: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), mPCR, ESBLs, *blaSHV* and *blaTEM* resistance genes.

Introdução

Atualmente, um dos mais graves problemas que atingem os serviços de saúde é o aumento da prevalência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos. A falta de adesão dos profissionais da saúde às medidas recomendadas para a prevenção da transmissão de micro-organismos e o uso inadequado de antimicrobianos estão entre as principais causas deste problema (ANVISA, 2008).

Nas últimas décadas, o aumento da resistência microbiana ocorreu principalmente entre os bacilos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.). Esses micro-organismos desenvolveram resistência inclusive aos antimicrobianos de amplo espectro mais comumente utilizados em ambientes hospitalares como as penicilinas, quinolonas, carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração (CDC, 2009).

Os β -lactâmicos são antimicrobianos, que incluem diferentes subclasses, como as penicilinas, cefalosporinas (que são subdivididas em quatro "gerações"), monobactâmicos e carbapenêmicos. Estes agentes são compostos que contêm um anel β -lactâmico e possuem atividade contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Seu mecanismo de ação é a inibição da ligação cruzada na síntese do peptídeoglicano, que faz parte da estrutura da parede celular das bactérias. Esta classe antimicrobiana atua através da

inibição das enzimas transpeptidases, que medeiam a ligação cruzada peptídica. No entanto, muitas espécies de bactérias possuem a capacidade de sintetizar β -lactamases, que são enzimas que hidrolisam o anel β -lactâmico das penicilinas, cefalosporinas e outros antimicrobianos (Junior, Ferreira & Conceição, 2004).

Alguns micro-organismos são considerados multidroga resistentes (MDR ou "multidrug-resistant") por apresentarem resistência ou sensibilidade intermediária a, pelo menos, três classes de antimicrobianos. Essas classes são definidas de acordo com a bactéria estudada (Magiorakos et al., 2012). Comumente, na prática clínica considera-se MDR os que são resistentes a duas classes ou mais.

A detecção precoce de linhagens bacterianas produtoras de β -lactamases é de fundamental importância para a prevenção da sua difusão, não só em instituições com elevadas prevalências de tais isolados, mas também naqueles locais em que os fenótipos de resistência nunca foram detectados (Bradford, 2001). Contudo, a detecção de linhagens produtoras dessas enzimas constitui um desafio aos laboratórios de microbiologia clínica, com impacto direto no controle deste mecanismo de resistência e no uso indevido de β -lactâmicos (Del Peloso et al., 2003).

As β -lactamases são codificadas por genes localizados em plasmídeos conjugativos, que são capazes de se replicar e disseminar entre bactérias de diferentes espécies ou gêneros (Picão & Gales, 2007). As enzimas do tipo TEM, SHV e CTX-M fazem parte das β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que são responsáveis por fenótipos de resistência às cefalosporinas de terceira geração (tais como cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona) e por sinergia com os inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico (Livermore, 1995).

As enzimas do tipo TEM são as β -lactamases mais frequentemente detectadas em bactérias Gram-negativas como Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Salverda, Visser & Barlow, 2012). Estima-se que 90% da resistência à ampicilina em *E. coli* seja devida à produção da β -lactamase do tipo TEM (Livermore, 1995).

As enzimas do tipo SHV (sulfidril variável), são importantes na disseminação de resistência em isolados clínicos na Europa e América, porém ela pode ser encontrada em todo o mundo (Jacoby & Munoz-Price, 2005). As ESBLs do tipo SHV são encontradas principalmente em amostras de *K. pneumoniae*, contudo, estas enzimas também têm sido encontradas em uma grande variedade de espécies da família Enterobacte-

riaceae (LUZZARO, 2006). As enzimas CTX-M (cefotaximases) estão em larga expansão e a sua disseminação global tem sido notória na última década (Bonnet, 2004). As enzimas CTX-M (cefotaximases) estão em larga expansão e a sua disseminação global tem sido notória na última década (Bonnet, 2004).

A avaliação de metodologias para rápida identificação de bactérias produtoras de ESBL é extremamente relevante. A técnica de LAMP (Loop mediated isothermal amplification), ou amplificação isotérmica de DNA tem se destacado por sua eficiência; baixo custo; alta especificidade; observação visual do resultado e não alteração da sensibilidade por componentes de amostras clínicas e por não exigir equipamentos de alto custo. Trata-se de é um método de amplificação de gênica que permite identificar pequenas quantidades de DNA em menos de uma hora, sob condições isotérmicas (Notomi et al., 2000). Esta técnica tem demonstrado ser uma excelente ferramenta para a identificação de genes que codificam enzimas de resistência.

Solanki et al., (2013) avaliaram a técnica de LAMP para detecção dos genes blaKPC e blaNDM, que são genes que codificam tipos de β -lactamases, em 60 isolados clínicos de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Acinetobacter baumannii*. Em seu estudo a técnica apresentou alta sensibilidade e especificidade, bem como tempo reduzido de reação em comparação com os métodos fenotípicos e de PCR convencional.

O principal objetivo deste trabalho foi detectar a presença de genes blaTEM e blaSHV relacionados às enzimas β -lactamases em amostras de hemocultura de microorganismos resistentes a carbapenêmicos e cefalosporinas empregando a técnica de amplificação isotérmica de DNA (LAMP).

Materiais e Métodos

Este estudo é de base experimental que utilizou inicialmente 108 amostras de hemoculturas positivas fornecidas pelo serviço de microbiologia do laboratório de análises clínicas de um hospital do município de Governador Valadares – Minas Gerais.

Isolamento e identificação das linhagens

As colônias bacterianas foram obtidas a partir de isolamento em meio ágar de infusão de cérebro e coração (BHI, Himédia) enriquecido com sangue. As linhagens foram caracterizadas por coloração de Gram

e identificadas utilizando as provas bioquímicas contidas no sistema Bactray I e II (LABORCLIN).

Testes de susceptibilidade antimicrobiana

Todas as linhagens bacterianas isoladas foram submetidas a testes de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizando o método de Kirby-Bauer de acordo com metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Para as Gram-negativas os discos testados foram: ampicilina (10 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefepime (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ciprofloxacina (30 μ g), levofloxacina (5 μ g), norfloxacina (10 μ g), imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), nitrofurantoina (300 μ g), ofloxacina (5 μ g), piperacilina+tazobactam (100\10 μ g), tetraciclina (30 μ g) e trimetropim (5 μ g). E para as Gram-positivas: ciprofloxacina (30 μ g), claritromicina (15 μ g), eritromicina (15 μ g), gentamicina (10 μ g), levofloxacina (5 μ g), penicilina G (10 U), tetraciclina (30 μ g), trimetropim (5 μ g) e ampicilina (10 μ g).

Testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a realização dos testes de microdiluição em caldo foram selecionadas 20 linhagens de bactérias Gram-negativas que apresentaram resistência a um maior número de antimicrobianos, em especial às cefalosporinas e carbapenêmicos, pelo método de Kirby-Bauer. Os antimicrobianos utilizados para o CIM foram: ampicilina, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, meropenem, norfloxacina e ofloxacina, obtidos da Sigma Chemical Corp (St. Louis, MO, EUA) e da Interlab (Distribuidora de Produtos Científicos LTDA).

Extração de DNA genômico

O DNA das 20 amostras de hemocultura e das linhagens selecionadas foram extraídos utilizando o protocolo descrito por Pitcher (1989) com reformulações. O DNA foi quantificado em BioSpec-nano a 260 e 280 nm e estocado à temperatura de -20°C.

Ensaio de PCR multiplex (mPCR)

As reações de mPCR foram realizadas em termociclador Mycycler Bio rad modelo 580BR3578 em um volume final de 25 μ L, contendo 0,5 μ L de cada iniciador específico senso e anti-senso (genes blaTEM e blaSHV), (10 pmol/L) acrescidos de 12,5 μ L de PCR Master Mix - Promega® [Taq DNA polimerase dNTPs, MgCl₂, tampão de PCR (pH 8,5)], 3,5 μ L do DNA molde, correspondendo à aproximadamente 100 ng de DNA, e 7 μ L de água ultrapura. A reação de amplificação seguiu as seguintes condi-

ções: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial) seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da mPCR foram revelados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio (10 µg/mL).

Ensaio de LAMP

Na reação de amplificação isotérmica de DNA em loop (LAMP) utilizou-se os seguintes reagentes: 6 mM de MgCl₂ (Promega), 1400 µM de cada dNTP (Promega), 0,8M de betaína, 5 pmol de cada iniciador externo (F3 e B3) e 40 pmol de cada iniciador internos (FIP e BIP), 20 pmol de cada iniciador do loop (LF e LB), 4,8U de Bst DNA Polymerase Large Fragment (New England BioLabs) e tampão 1× (ThermoPol Reaction Buffer: 20 mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 2mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, pH 8,8) (New England BioLabs) e adicionadas de 120 µM de azul de hidroxinaftol (Sigma-Aldrich). As reações foram preparadas para um volume final de 25 µL, incluindo 4 µL da amostra de DNA. Antes de se efetuar a reação de LAMP todas as amostras de DNA foram submetidas a uma desnaturação prévia a 95°C durante 10 minutos, com posterior resfriamento a 4°C. Em seguida, as os tubos foram incubados em banho-maria com temperatura de 60°C durante 60 minutos.

Após a incubação as amostras foram submetidas a 80°C durante 2 minutos para inativação da polimerase (Bst). As reações de LAMP foram analisadas visualmente pelo surgimento da cor azul indicada pela reação do azul de hidroxinaftol com o pirofosfato de magnésio acumulado durante a reação (Goto et al., 2009). As reações também foram analisadas em gel de agarose a 1,5%. A corrida foi realizada a 110 V no tempo médio de 90 min. O gel foi corado com brometo de etídio para visualização dos fragmentos sob exposição de luz UV e posteriormente fotografados.

Iniciadores utilizados para ensaio de LAMP

Os iniciadores dos genes utilizados nos ensaios de LAMP foram desenhados a partir do software “Primer Explorer” da empresa Japonesa Eiken Chemical Co.Ltd., disponibilizado pelo site (http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html) (Tabela 1). As sequências dos genes utilizados para o desenho dos iniciadores estão depositadas no GenBank: gene blaSHV1 de Klebsiella pneumoniae nº de depósito X98098 e gene blaTEM de Klebsiella pneumoniae nº de depósito EF125012.

Tabela 1. Iniciadores para ensaios de LAMP (deste estudo) e mPCR utilizados para detecção de genes blaTEM e blaSHV.

	Gene alvo	Primer	Sequência
LAMP	<i>bla</i> _{TEM}	F3	CGGCATTTTGCCTTCCTGT
		B3	CGACCGAGTTGCTCTTGC
		FIP	ACTCGTGCACCCAAGTATCTT-TTTGCTCACCCAGAAACGC
		BIP	ATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCG-GGGATAATACCGCACCACAT
		LF	TTTGCTCACCCAGAAACGC
		LB	GGATAATACCGCACCACAT
	<i>bla</i> _{SHV}	F3	TGCGTTATATTCGCCTGTGT
		B3	GCGCCGCAGAGCACTA
		FIP	TTGCTCAAGCGGCTGCGGG-ATCTCCCTGTTAGCCACCCT
		BIP	TAGAAATGGATCTGGCCAGCGG-TCATGGGAAAGCGTTCATCG
		LF	ATCTCCCTGTTAGCCACCCT
		LB	TGGGAAAGCGTTCATCGG
	Gene alvo	PB	Sequência
mPCR	<i>bla</i> _{TEM-1}	800	F- AGATCAGTTGGGTGCACGAG R- CTTGGTCTGACAGTTACC
		713	F- TTCGCCTGTGTATTATCTCCCTG R- TTAGCGTTGCCAGTGYTCG

Resultados e discussão

Identificação e seleção das linhagens resistentes

Das 108 linhagens bacterianas isoladas das hemoculturas, 80 (74,05%) eram Gram-positivas e 28 (25,9%) Gram-negativas. Esse resultado difere do trabalho realizado por Menezes et al., (2008) que encontrou em seu trabalho em um hospital de Fortaleza 60,5% de bactérias Gram-negativas e 39,5% Gram-positivas. Já Leão et al., (2007) encontrou que os Gram-positivos correspondiam a 50% dos isolados, e os bastonetes Gram-negativos representaram 50%. Essa variação que ocorre entre os hospitais é possível devido as diferenças entre os procedimentos adotados, do público que é atendido e dos antimicrobianos que são utilizados.

O método de Kirby-Bauer foi utilizado para traçar o perfil de resistência aos antimicrobianos das 108 linhagens iniciais isoladas das hemoculturas. De acordo com o resultado, foram selecionadas 20 linhagens Gram-negativas que apresentaram resistência a um maior número de antimicrobianos, em especial às cefalosporinas e carbapenêmicos (Tabela 2).

A produção de enzimas β-lactamases é o principal mecanismo de resistência aos agentes antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos encontrado em bactérias Gram-negativas (Livermore, 1995). As β-lactamases são produzidas por inúmeras espécies bacterianas, porém com diversidades estruturais e localizações diferentes. Nas bactérias Gram-positivas, as β-lactamases são secretadas para o meio extra-celular, fazendo com que elas apresentem uma atividade menor que as β-lactamases produzidas pelas bactérias Gram-negativas que se encontram no espaço periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agirem de modo mais eficaz sobre os β-lactâmicos (Silva, 2000). Desta forma, as bactérias Gram-negativas, produtoras de ESBLs, são as principais responsáveis pela disseminação de genes de resistência em ambientes hospitalares (Winokur et al., 2001).

Tabela 2. Perfil de resistência aos antimicrobianos de linhagens isoladas das hemoculturas.

ID	Linhagem	CEFALOSPORINAS				CARBAPENÊMOS		QUINOLONAS				PENICILINAS		OUTRAS		
		Cefepima	Cefotaxima	Ceftazidima	Ceftioxona	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Norfloxacina	Ofloxacina	Ampicilina	Piperacilina + tazobactam	Nitrofurantoina	Tetraciclina	Trimetoprim
1	<i>Klebsiella ozanae</i>	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
2	<i>Klebsiella ozanae</i>	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	I	S	R	R
3	<i>Burkholderia cepacea</i>	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S
5	<i>Hafnia alvei</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
8	<i>Hafnia alvei</i>	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S
9	<i>Klebsiella ozanae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
10	<i>Burkholderia cepacea</i>	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R
11	<i>Burkholderia cepacea</i>	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R
12	<i>Burkholderia cepacea</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
13	<i>Klebsiella ozanae</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
15	<i>Hafnia alvei</i>	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
16	<i>Hafnia alvei</i>	R	R	R	R	S	S	I	S	S	R	R	R	S	R	R
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
18	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
19	<i>Klebsiella ozanae</i>	R	R	R	R	S	S	I	S	S	R	R	S	I	R	R
20	<i>Klebsiella ozanae</i>	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	I	I	R	R

R- Resistente, I – Intermediário, S – Sensível

Das 20 linhagens bacterianas analisadas, 15 foram resistentes a pelo menos três classes de antimicrobianos, sendo caracterizadas como MDR, e 5 foram resistentes a menos que três classes. Observou-se que somente uma das linhagens selecionadas possuía sensibilidade frente à ampicilina caracterizando que 19 linhagens (95%) possuíam resistência a este antimicrobiano. No entanto, para a piperacilina (uma penicilina) em associação com tazobactam, 4 linhagens (20%) demonstraram resistência e 2 (10%) possuíam resistência intermediária.

Na análise do perfil de resistência para os antimicrobianos da classe das cefalosporinas, 13 linhagens (65%) possuíam resistência a cefepime, que é a única cefalosporina de quarta geração atualmente disponível. Para as cefalosporinas de terceira geração testadas, cefotaxima e ceftazidima, 15 linhagens (75%) demonstraram-se resistentes. E para ceftriaxona 14 (70%) eram resistentes. Na classe dos carbapenêmicos, 5 linhagens (25%) possuíam resistência ao imipenem e 6 linhagens (30%) ao meropenem.

Para a classe das quinolonas, 14 linhagens (70%) apresentaram-se resistentes a ofloxacina, enquanto para ciprofloxacina foram 12 linhagens (60%). Já para levofloxacina e norfloxacina 9 linhagens (45%) apresentaram resistência a cada um destes. Em relação as outras classes citadas na tabela 2, 6 linhagens (30%) foram resistentes a nitrofurantoína, 7 linhagens (35%) foram resistentes a tetraciclina e 11 (55%) ao trimetropim.

Deteção de genes relacionados às β -lactamases

As 20 linhagens bacterianas selecionadas foram submetidas a testes de determinação de CIM. Nos ensaios foram utilizados 7 agentes antimicrobianos para avaliar quantitativamente o perfil de resistência aos antimicrobianos das linhagens selecionadas utilizando o CLSI (2014). Foi observado que o resultado do teste de CIM e do antibiograma de Kirby-Bauer apresentaram resultados complementares.

Tabela 3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antimicrobianos para as linhagens selecionadas e detecção dos genes blaSHV e blaTEM.

ID	Linhagem	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$)							Genes detectados	
		Ampicilina	Cefepime	Ciprofloxacina	Levofloxacina	Meropenem	Norfloxacina	Ofloxacina	LAMP	Mpcr
1	<i>Klebsiella ozanae</i>	>128	128	64	32	<0,25	64	32	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>
2	<i>Klebsiella ozanae</i>	>128	1	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>
3	<i>Burkholderia cepacea</i>	>128	16	32	32	<0,25	64	64	ND	ND
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4	16	2	2	4	2	1	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>
5	<i>Hafnia alvei</i>	>128	16	12	8	2	64	16	ND	ND
6	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>128	>128	64	32	4	64	64	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>
7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	>128	>128	64	32	32	64	64	<i>blaSHV</i>	<i>blaSHV</i>
8	<i>Hafnia alvei</i>	>128	1	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	ND	ND
9	<i>Klebsiella ozanae</i>	32	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<i>blaSHV</i>	ND
10	<i>Burkholderia cepacea</i>	>128	16	64	16	<0,25	64	64	ND	ND
11	<i>Burkholderia cepacea</i>	>128	8	64	16	<0,25	64	64	ND	ND
12	<i>Burkholderia cepacea</i>	>128	1	0,5	1	1	1	1	ND	ND
13	<i>Klebsiella ozanae</i>	>128	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<i>blaSHV</i>	<i>blaSHV</i>
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>128	>128	64	128	>128	64	64	ND	ND
15	<i>Hafnia alvei</i>	32	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	0,25	ND	ND
16	<i>Hafnia alvei</i>	>128	8	1	0,5	<0,25	2	2	<i>blaTEM</i>	<i>blaTEM</i>
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>128	1	2	0,5	1	<0,25	<0,25	ND	ND
18	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	>128	128	32	4	64	64	4	<i>blaTEM</i>	<i>blaTEM</i>
19	<i>Klebsiella ozanae</i>	>128	16	1	0,5	<0,25	2	0,5	<i>blaSHV</i>	<i>blaSHV</i>
20	<i>Klebsiella ozanae</i>	>128	16	2	0,5	<0,25	4	0,5	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i> e <i>blaTEM</i>

ND: não detectados

Em todas as linhagens de bactérias testadas, os resultados para a detecção dos genes foram correspondentes em ambas as técnicas (LAMP e mPCR), com exceção de uma linhagem de *Klebsiella ozanae* (ID 9), que apresentou apenas o gene *blaSHV* pela técnica de LAMP. A enzima β -lactamase do tipo SHV é mais frequentemente encontrada em *Klebsiella* spp., sendo este gênero responsável por mais de 20% da resistência à ampicilina (Babini & Livermore, 2000).

Das linhagens de *Klebsiella ozanae* testadas (n=6), 3 apresentaram positividade para ambos os genes *blaSHV* e *blaTEM*, e 3 apresentaram somente o gene *blaSHV* pela técnica de LAMP. Entretanto, na técnica de mPCR foi possível a detecção deste gene em apenas 2 linhagens bacterianas. No estudo realizado por Solanki et al., (2013), comparando a técnica de LAMP e PCR convencional foram submetidas 60 amostras ao ensaio para a detecção dos genes *blaKPC* e *blaNDM-1*. Neste estudo, observou-se que no ensaio de LAMP esses genes foram encontrados em quatro isolados não detectados pelo PCR convencional. Isso demonstra que o ensaio de LAMP tem uma maior sensibilidade em comparação com o PCR.

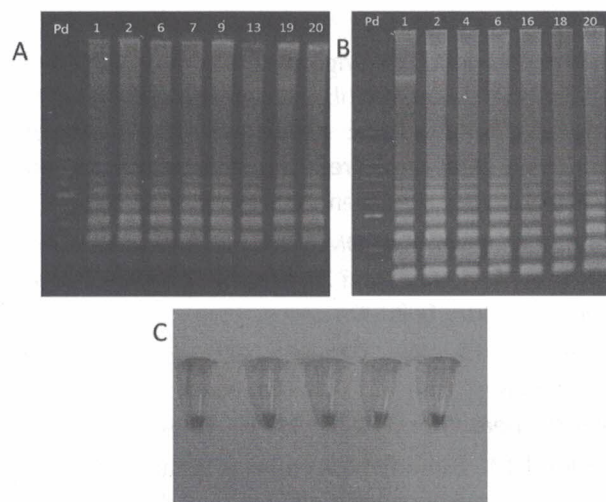
Nas linhagens de *Acinetobacter baumannii* (n=3), 2 apresentaram ambos os genes *blaSHV* e *blaTEM* e uma apenas o gene *blaSHV*. Todas as linhagens de *Acinetobacter baumannii* testadas demonstraram ser resistentes ao meropenem, um antimicrobiano da classe dos carbapenêmicos. Os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento das infecções por bactérias produtoras de ESBL são os carbapenêmicos (imipenem e meropenem), por elas não sofrerem hidrólise pela ESBL. No entanto, é possível que esta resistência vem ocorrendo devido à co-produção de carbapenamases simultaneamente à produção de ESBL.

Das linhagens de *Hafnia alvei* testadas (n=4), uma apresentou o gene *blaTEM* e nenhuma apresentou o gene *blaSHV*. A linhagem de *Alcaligenes xilosoxidans* (n=1) testada, apresentou apenas o gene *blaTEM*. E nas linhagens de *Burkholderia cepacea* (n=4) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=2) não foram detectados nenhum dos genes pesquisados. As ESBLs são detectadas com pouca frequência em *Pseudomonas aeruginosa*. Porém nos estudos de Xiaofei Jiang et al, 2006 as ESBLs em *Pseudomonas* spp. demonstraram uma alta frequência nos isolados pesquisados.

Os resultados da técnica de LAMP podem ser

visualizados a olho nu, através da formação de um precipitado azul pela reação do pirofosfato de magnésio com o azul de hidroxinaftol, essa coloração pode ser observada quando o gene de interesse é amplificado. Além da detecção visual, os amplicons foram revelados em gel de agarose 1,5% (Figura 1) onde foi possível observar as bandas de amplificação por LAMP no qual apresentam um padrão em escada visto que, os produtos finais da reação são uma mistura de DNA em loop de vários tamanhos.

Figura 1. Visualização do produto amplificado em gel de agarose pelo ensaio LAMP. A: *blaSHV* B: *blaTEM*, C: Resultado visível a olho nu



Todas as linhagens que apresentaram os genes *blaSHV* e *blaTEM* tiveram o seu DNA extraído diretamente da hemocultura, possibilitando diminuir fases do processo como o isolamento das linhagens, o que levaria um maior tempo para a avaliação. Segundo Sun et al., (2010) e Suzuki et al., (2006) a sensibilidade do LAMP parece não ser afetada pela presença de DNA não alvos nas amostras, nem por inibidores de PCR conhecidos, demonstrando que este método é muito robusto.

A técnica de LAMP possibilitou a identificação dos genes *blaTEM* e *blaSHV* em bactérias MDRs em amostras de hemoculturas, permitindo direcionar o tratamento nos casos de infecções com bactérias produtoras dessas enzimas, principalmente no quadro de septicemia, onde a taxa de letalidade é alta.

Conclusão

A técnica de LAMP e o mPCR foram eficazes na detecção dos genes *blaSHV* e *blaTEM* em bactérias

MDRs, utilizando diretamente amostras de hemocultura. No entanto a técnica de LAMP demonstrou-se mais eficiente por ser realizada em menor tempo, não necessitar de equipamentos sofisticados, como o termociclador, além da fácil interpretação dos seus resultados. O método de LAMP é uma alternativa promissora na identificação de linhagens que apresentam mecanismos de resistência, contribuindo para um maior controle da disseminação desses micro-organismos, especialmente pela possibilidade de execução em laboratórios com recursos limitados e/ou em campos de pesquisa.

Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Uso racional de antimicrobianos para prescritores ATM-razional*. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/inicio.htm>. Acesso em: 20/04/2015.

Babini G & Livermore DM. Are SHV β -lactamase universal in *K. pneumoniae*? *Antimicrob. Agents Chemother.*, 8: 2230 – 1, 2000.

Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M **Enzymes**. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48 (1): 1 – 14, 2004.

Bradford PA. Extended spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 (4): 933 – 951, 2001.

Center for Diseases Control and Prevention (CDC). *National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS)*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/nnis_pubs.html>. Acesso em: 20/04/2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*. M100-S24. Wayne, PA: 2014. (CLSI **Document M100-S24**).

Del Peloso PF, Leite CCF, Silva HP, Filho HMT. Importância da Utilização de Metodologias para a Detecção de ESBL em Espécies de Enterobactérias. *NewsLab: a revista do laboratório moderno*, 56: 118 – 128, 2003.

Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques* 46:167 – 172, 2009.

Jacoby GA & Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *New England journal of medicine*, 352: 380 – 391, 2005.

Junior MAS, Ferreira ES, Conceição GC. Betalactamasas de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. *NewsLab: a revista do laboratório moderno*, 63: 152 – 174, 2004.

Leão LSNO, Passos XS, Reis C, Valadão LMA, Silva MRR, Pimenta FC. Fenotipagem de bactérias isoladas em hemoculturas de pacientes críticos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(5): 537 – 540, 2007.

Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Trends in Production of Extended-Spectrum β -Lactamases Among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 1659-1664, 2006.

Livermore DM. β -lactamases in clinical and laboratory resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 557 – 584, 1995.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* Mar,18(3): 268 – 281, 2012.

Menezes EA, Alencar AM, Cunha FA, Ângelo MRF, Salviano MNC, Oliveira IRN. Frequência de cepas produtoras de enzima beta lactamase de espectro expandido (ESBL) e perfil de susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* em hemoculturas no berçário de um hospital de Fortaleza. *Rev. bras. anal. clin.*, 40 (1): 7 – 11, 2008.

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28 (12): i – vii, 2000.

Picão RC & Gales AC. β -Lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em *Pseudomonas aeruginosa*: Pesadelo ou só Imaginação. *Prática hospitalar*, 49: 79 – 84, 2007.

Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8: 151 – 156, 1989.

Salverda MLM, Visser JAGM, Barlow M. Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev.*, 34: 1015 – 1036, 2010.

Silva CHPM. Beta lactamase de espectro estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial. *Rev. bras. anal. clin.*, 32 (3): 215 – 219, 2000.

Solanki R, Vanjari L, Ede N, Gungi A, Soory A & Vemu L. Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC} genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates. *J Med Microbiol.*, 62: 1540 – 1544, 2013.

Sun J, Najafzadeh MJ, Vicente V, Xi L, de Hoog GS. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by Fonsecaea agents of chromoblastomycosis. *J Microbiol Methods*, 80 (1): 19 – 24, 2010.

Suzuki S, Taketani H, Kusumoto KI, Kashiwagi Y. High-Throughput Genotyping of Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* Based on Colony Direct Polymerase Chain Reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102 (6): 572 – 74, 2006.

Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the Prevalence of Strains Expressing an Extended-Spectrum β -Lactamase Phenotype and Characterization of Isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific Region. *Clinical Infectious Diseases*, 32 (2): 94 – 103, 2001.