VII EAITI 2017
ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO TECNOLÓGICA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
09 e 10 de novembro de 2017

PADRONIZAÇÃO DA MULTIPLEX-PRC PARA DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS.

Luiza Camila da Silva – PIBIT/CNPq-FA-UEM, Profª Drª Maria Cristina Bronharo Tognim, cristinatognim@gmail.com .

Universidade Estadual de Maringá – UEM / Departamento de Ciências Básicas da Saúde - DBS.

Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Aplicada - Médica

Palavras Chave: *Carbapenemases, Enterobactérias, Multiplex-PCR*

Resumo

A presença de genes de e resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias é de extrema importância pois muitas vezes os métodos fenotípicos ou automatizados são ineficazes para sua detecção. Nopresente estudo padronizou-se a reação de PCR do tipo multiplex para os genes de resistência à carbapenêmicos blaKPC, blaNDM e blaOXA-48 possibilitando a detecção rápida e simultânea desses genes

Introdução

As carbapenêmicos são β-lactâmicos de amplo espectro utilizados em infecções sistêmicas graves, geralmente causadas por bactérias mutirresistentes. Nos últimos anos um número crescente de enterobacterias produtoras de enzimas carbapenemases tem surgido causando grande preocupação. As classes de enzimas mais comumente encontradas em enterobactérias são: 1) metalo β-lactamases do tipo NDM; 2) OXA-carbapenemase do tipo OXA-48 e 3) carbapenemase do tipo Klebsiella pneumoniae carbapenemase-KPC. Embora testes fenotípicos e automatizados possam sugerir a presença enzimática apenas a detecção molecular dos genes é confirmatória. Reações multiplex-PCR detectam simultaneamente vários genes, sendo mais rápidas e práticas para a detecção dois genes ou mais do que a single-PCR. A diferença do perfil migratório no gel possibilita que os genes sejam testados em uma mesma reação. Considerando-se a necessidade de detecção rápida dos genes de resistência o presente estudo objetivou a padronização de uma PCR do tipo multiplex para as principais carbapenemase presentes em enterobacterias .

Material e Métodos

Para testes foram selecionadas amostras de enterobactérias sabidamente positivas (controle de qualidade) para os genes blaOXA- 48 e blaNDM, e blaKPC. Adicionalmente 20 isolados clínicos e de culturas vigilância de pacientes hospitalizados no Hospital Universitário de Maringá com resistência a pelo menos um carbapenêmicos foram incluídos. O DNA bacteriano total foi obtido por fervura seguido por centrifugação. Para amplificação do gene blaKPC utilizou-se o primer descrito por Bradford et al (2004), com amplicon final de 893 pares de base (pb) e para os genes blaNDM e blaOXA-48 utilizou-se os primers descritos por Poirel et al (2011), com amplicons de 621 pb e 438 pb, respectivamente. Durante o estudo, diferentes concentrações e temperaturas foram testadas até a obtenção da reação padronizada.

Resultados Obtidos

Um total 50 reações com diferentes temperaturas de anelamento, variando de 50º a 55ºC, foram testadas até obter-se as condições ideais de reação. A temperatura ótima foi 54ºC, sendo que nas demais houve anelamentos inespecíficos. A concentração de 10pmol de DNA não necessitou ser alterada. A padronização segue as seguintes condições:

1) Reação: 2 µL de DNA bacteriano total extraído adicionado à solução mãe, contendo 1x Taq polimerase *buffer*, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl2, 10 pmol/µL de cada *primer*, 5U de Taq DNA polimerase e agua q.s.p. 15 µL. 2) Ciclagem: 10min - 94ºC, 30 ciclos de 45seg - 94ºC, 30seg - 54ºC e 1min - 72ºC, e 5' - 72ºC. 3) Eletroforese: gel de agarose 1,5% a 100V - 60min, em TBE 0,5X, corado com brometo de etidio. 4) Revelação: sob transiluminador UV.

Após padronizada, a reação foi realizada em 20 isolados clínicos, sendo identificadas amostras que possuiam apenas um dos genes pesquisados (quatro apresentando KPC e uma NDM), que apresentavam mais de um gene (amostra positiva para KPC e NDM) e as negativas não apresentaram bandas (14 negativas), demonstrando alta especificidade da reação. Dentre os isolados clínicos testados, não encontrou-se amostras positivas para OXA-48. Todos os isolados positivos foram encaminhados ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN) e estes foram confirmados pela metodologia de PCR em tempo real.

Conclusão

A padronização da reação de multiplex-PCR foi realizada com sucesso e de acordo comos bons resultados obtidos em isolados clínicos tanto positivos quanto negativos para os genes pesquisados podemos afirmar que a reação padronizada pode ser utilizada na rotina clinica como também em pesquisas auxiliando no controle e disseminação enterobacterias portadoras dos genes de carbapenemase (blaNDM e blaOXA-48 e blaKPC).

Agradecimentos

Agradecimentos à Fundação Araucária pelo apoio financeiro recebido para viabilizar esta participação

ANVISA - Nota Técnica nº 1/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília, DF, 2013.

Bradford, P. A., Bratu S., Urban C., et al. Emergence of carbapenem-resistant Klebsiella species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. Clin. Infect. Dis. 2004, 39, 55–60.

Poirel L., Walsh T. R., Cuvillier V., Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2010, 70, 119–123.