

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

**CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO
ENZIMÁTICA DA METALO- β -LACTAMASE DO TIPO NDM PARA
PADRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO**

ISADORA RODRIGUES DA SILVA

**Rio de Janeiro
2017**



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia
em Imunobiológicos
Bio-Manguinhos

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

ISADORA RODRIGUES DA SILVA

CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO
ENZIMÁTICA DA METALO- β -LACTAMASE DO TIPO NDM PARA
PADRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

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
2017

Ficha catalográfica elaborada pela
SIGDA - Seção de Gestão de Documentos e Arquivos
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ - RJ

S586

Silva, Isadora Rodrigues da.

Clonagem, expressão, purificação e avaliação enzimática da metalo- β -lactamase do tipo NDM para padronização de teste imunocromatográfico. / Isadora Rodrigues da Silva. – Rio de Janeiro, 2017.

xiv, 76 f. : il. ; 30 cm.

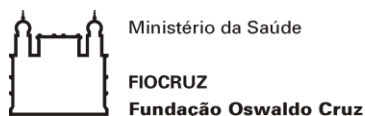
Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Pós-Graduação em Tecnologia de Imunobiológicos, 2017.

Bibliografia: f. 67-75

1. NDM. 2. Teste imunocromatográfico. 3. Diagnóstico. I. Título.

CDD 660.65

Trabalho realizado no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) e Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, sob orientação do Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna e no Laboratório de Infecção Hospitalar (LAPIH), do Instituto Oswaldo Cruz, sob orientação do Prof. Dr. Cláudio Marcos Rocha.



INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS

Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

ISADORA RODRIGUES DA SILVA

CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA DA METALO- β -LACTAMASE DO TIPO NDM PARA PADRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

ORIENTADORES: Prof. Dr. Cláudio Marcos Rocha

Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna

Dissertação aprovada em 06 de junho de 2017.

Examinadores:

Prof^a. Dra. Marise Dutra Asensi
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/Presidente

Prof^a. Dra. Regina Helena Saramago Peralta
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof^a. Dra. Patrícia Alvarez Baptista
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

**Rio de Janeiro
2017**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Regina e Hilton,
que são minha inspiração para que eu continue a ir atrás
de meus sonhos e enfrente os obstáculos da vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho.

À Fiocruz e à Bio-Manguinhos pela oportunidade e pelo auxílio financeiro.

À minha família, Regina, Hilton, Mateus, e ao meu companheiro Luis Renato, pela torcida de sempre, por apoiarem minhas decisões e pela confiança.

Ao Prof. Cláudio Marcos Rocha pela paciência, por acreditar no meu potencial e pela ótima experiência. Agradeço por todos os conselhos, ensinamentos e pelo companheirismo.

Ao Prof. José Procópio Moreno Senna por sua orientação neste trabalho e pelo apoio.

À Aline Rodrigues Bernardo, por sua ajuda no desenvolvimento deste projeto, pelos conselhos especiais e por toda sua alegria e otimismo!

Ao Dr. Edimilson Domingos da Silva pelos constantes conselhos e por conceder o espaço do LATED para desenvolvimento neste trabalho.

Às Prof. Dra. Marise Dutra Asensi e Prof. Dra. Ana Paula D'Allincourt Carvalho Assef pela colaboração no desenvolvimento deste projeto e por conceder o espaço do LAPIH para os experimentos.

Aos amigos do LAPIH, Caio Aires, Natacha Pereira, Thamirys Oliveira, Ivson Cassiano, Bianca Costa, Mariana Accampora e Orlando Neto, que tornaram os dias de trabalho mais divertidos e prazerosos.

Aos colegas do LATED pela simpatia, por me acolherem com tanto carinho e por todo o apoio no desenvolvimento deste projeto.

Aos colegas do LATER, principalmente Cristiane Pinheiro Pestana, Haroldo Cid da Silva Júnior e Ana Caroline Cavalcante de Araújo pelo companheirismo, momentos especiais e pelo apoio.

Aos amigos do MPTI pelos momentos especiais durante as disciplinas.

Aos professores, coordenação e secretaria, pelo suporte dado ao desenvolvimento desta dissertação.

*Não são nossas habilidades que revelam quem realmente somos,
são as nossas escolhas.*

J. K. Rowling

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	ix
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cenário atual da resistência bacteriana aos antimicrobianos	1
1.2. Mecanismos de ação dos antimicrobianos	3
1.3. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos	4
1.4. β -lactamases	6
1.5. Carbapenemases	6
1.6. Metallo- β -lactamases	8
1.7. NDM	9
1.8. Importância do diagnóstico de bactérias produtoras de NDM	15
1.9. Métodos diagnósticos para detecção de bactérias produtoras de carbapenemases	16
1.10. Imunocromatografia de fluxo lateral	18
1.10.1. Anticorpos e Marcadores	21
1.11. Justificativa	22
II. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo	23
2.2. Objetivos específicos	23
III. METODOLOGIA	24
3.1. Fluxograma	24
3.2. Amostras bacterianas	25
3.2.1. Identificação das amostras bacterianas da CCBH	26
3.2.2. Avaliação da presença do gene <i>bla</i> _{NDM} nas amostras bacterianas	26
3.3. Análise das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das variantes de <i>bla</i> _{NDM}	27
3.4. Clonagem, expressão, purificação e avaliação da atividade enzimática de rNDM	27
3.4.1. Amplificação do gene <i>bla</i> _{NDM}	27
3.4.2. Obtenção de clones recombinantes de <i>E. coli</i> TOP10 com a construção pET28a+ <i>bla</i> _{NDM}	28
3.4.3. Sequenciamento das construções pET28a+ <i>bla</i> _{NDM}	29
3.4.4. Obtenção de clones de <i>E. coli</i> BL-21 STAR™ (DE3) contendo a construção pET28a+ <i>bla</i> _{NDM}	30
3.4.5. Indução da expressão de rNDM	30
3.4.6. Análise da expressão e da solubilidade por SDS-PAGE	31
3.4.7. Purificação da rNDM por IMAC (cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados)	31
3.4.8. Avaliação biológica de rNDM	32

3.5. Obtenção de IgG anti-rNDM	33
3.5.1. Determinação do título de anticorpos anti-rNDM no soro policlonal.....	33
3.5.2. Precipitação de IgG com sulfato de amônio.....	34
3.5.3. Dessalinização por Gel Filtração.....	34
3.5.4. Purificação de IgG por cromatografia de Troca Iônica.....	34
3.6. Conjugação de IgG purificada com peroxidase para ensaios de ELISA	35
3.7. Conjugação de IgG purificada com ouro coloidal	35
3.8. Padronização e avaliação do potencial da IgG anti-rNDM de detectar a proteína recombinante e a proteína nativa em lisados bacterianos por ELISA	35
3.9. Construção e padronização de um teste imunocromatográfico para detecção de NDM36	
3.10. Avaliação preliminar do teste imunocromatográfico padronizado com amostras bacterianas	40
3.11. Determinação do limite de detecção de rNDM pelo teste imunocromatográfico.....	40
IV. RESULTADOS & DISCUSSÃO.....	41
4.1. Análise das sequências de nucleotídeos das variantes de <i>bla</i> _{NDM}	41
4.2. Avaliação da presença do gene <i>bla</i> _{NDM} em clones recombinantes de <i>E. coli</i> TOP10 ...	41
4.2. Expressão de rNDM em <i>E. coli</i> BL-21 STAR™ (DE3) e análise da expressão e solubilidade	44
4.3. Purificação de rNDM.....	46
4.4. Detecção de proteína recombinante com cauda de polihistidina	49
4.5. Avaliação biológica da rNDM	50
4.6. Determinação do título de anticorpos no soro policlonal anti-rNDM	51
4.7. Avaliação do processo de purificação de IgG a partir do soro hiperimune	51
4.8. Avaliação do potencial de reconhecimento de NDM pela IgG e determinação do limite de detecção de NDM em lisado bacteriano.....	53
4.9. Determinação do melhor cruzamento de teste imunocromatográfico para detecção de NDM	56
4.9.1. Primeira padronização com rNDM	56
4.9.2. Segunda padronização com rNDM	59
4.9.3. Resultado da avaliação preliminar do teste imunocromatográfico com outras amostras bacterianas.....	62
V. CONCLUSÃO	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μg - micrograma

μM - micromolar

μL - microlitro

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b - base

BCA - *bicinchoninic acid* (ácido bicinconínico)

BHI - *Brain Heart Infusion* (infusão coração e cérebro)

BSA - *bovine serum albumin acetylated* (albumina de soro bovino acetilada)

CCBH - Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CIM - concentração inibitória mínima

CLED - *cystine lactose eletrolyte deficient*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standard Institutes*

CO₂ - dióxido de carbono

-COOH - ácido carboxílico

CTX-M - cefotaximases

D.O. - densidade ótica

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

E. coli - *Escherichia coli*

EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorção enzimática)

ERC - Enterobactérias resistentes a carbapenemase

ESBL - *extended spectrum β-lactamase* (β-lactamase de espectro estendido)

EMAs - enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

EUA - Estados Unidos da América

FAO - *Food And Agriculture Organization Of The United Nations* (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

g - grama

h - hora

H₂S - sulfeto de hidrogênio

H₂SO₄ - ácido sulfúrico

H₃BO₃ - ácido bórico

HRP - *horseradish peroxidase* (peroxidase de raiz forte)

IgG - imunoglobulina G

IMAC - *immobilized metal ion affinity chromatography* (cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados)

IMP - imipenemase

IOC - Instituto Oswaldo Cruz

IPTG - isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo

IRAS - infecções relacionadas a assistência em saúde

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

KCl - Cloreto de potássio

kDa - quilo Dalton

KH₂PO₄ - fosfato monopotássico

KPC - *Klebsiella pneumoinae* carbapenemase

L - litro

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública

LAEAN - Laboratório de Experimentação Animal

LAPIH - Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar

LATED - Laboratório de Tecnologia Diagnóstica

LATER - Laboratório de Tecnologia Recombinante

LB - Luria-Bertania (meio de cultura)

M - molar

mM - milimolar

MALDI-TOF - *Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight* (ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo)

mg - miligrama

min - minuto

mL - mililitro

MRSA - *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a meticiclina)

MSSA - *methicillin-sensitive Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* sensível a meticiclina)

Na₂B₄O₇ - borato de sódio anidro

Na₂HPO₄ - fosfato dissódico

NaCl - cloreto de sódio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NDM - *New Delhi metallo-β-lactamase* (Nova Déli metalo-β-lactamase)

ng - nanograma

NH₂ - amina

Nm - nanômetros

° C - grau Celsius (unidade de temperatura)

OIE - *World Organization For Animal Health* (Organização Mundial para Saúde Animal)

OMS - Organização Mundial da Saúde

OMV - *outer membrane vesicle* (vesícula de membrana externa)

OPAS - Organização Pan-americana da Saúde

OXA - oxacilinase

p - pico

P. rettgeri - *Providencia rettgeri*

pb - pares de base

PBP - *penicilin-binding protein* (proteína ligadora de penicilina)

PBS - tampão fosfato salina

PBS-T - tampão fosfato salina acrescido de Tween 20

PCR - reação em cadeia da polimerase

pH - potencial hidrogeniônico

PMSF - fluoreto de fenilmetilenosulfonila

qPCR - reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

RNA - *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

rNDM - NDM recombinante

rpm - rotações por minuto

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

SMART - *Monitoring Antimicrobial Resistance Trends* (Monitoramento de Tendências na Resistência aos Antimicrobianos)

SDS - *sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

PAGE - *polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida)

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

TMB - tetrametilbenzidina

TMI - tampão de migração para *Immunoblot*

Tris - tris (hidroximetil) amino metano

TSB - caldo soja tripticaseína

TSI - ágar tríplice açúcar e ferro

u - unidade

UTI - unidade de terapia intensiva

UV - ultravioleta

VIM - *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*

VRE - *Enterococcus* resistente a vancomicina

RESUMO

CLONAGEM, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA DA METALO- β -LACTAMASE DO TIPO NDM PARA PADRONIZAÇÃO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO

Bactérias produtoras de β -lactamases tipo NDM são um grave problema de saúde pública. Esses patógenos possuem perfil multirresistente e causam infecções hospitalares de difícil tratamento, restando poucas opções terapêuticas disponíveis e culminando em altas taxas de mortalidade. Adicionalmente, diferentes espécies bacterianas já foram identificadas como produtoras de NDM, indicando seu grande poder de disseminação. A Organização Mundial da Saúde recomenda a implementação de estratégias de controle e prevenção da resistência através de desenvolvimento de testes diagnósticos simples e rápidos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi a clonagem, expressão, purificação e avaliação enzimática da metalo-beta-lactamase do tipo NDM visando a padronização de um teste imunocromatográfico para a detecção de bactérias produtoras de NDM. Para tal, realizou-se a clonagem e expressão do gene *bla*_{NDM} proveniente de uma cepa de *K. pneumoniae*, seguida pela purificação da rNDM e imunizações de coelhos com a proteína recombinante adsorvida a hidróxido de alumínio para obtenção de soro policlonal anti-rNDM. Após esta etapa, procedeu-se à avaliação do potencial do anticorpo policlonal para detecção de rNDM e de amostras bacterianas produtoras e não produtoras de NDM através de ELISA e por imunocromatografia de fluxo lateral. A avaliação do anticorpo policlonal por ELISA evidenciou uma especificidade e sensibilidade de 100%. O teste imunocromatográfico padronizado foi capaz de detectar rNDM com sucesso, bem como a proteína nativa em diferentes amostras clínicas. Os resultados obtidos na plataforma imunocromatográfica demonstraram que o anticorpo policlonal anti-rNDM possui potencial para ser empregado no diagnóstico de bactérias produtoras de NDM. Estratégias como o uso de anticorpos monoclonais em associação ao policlonal e a avaliação de outras condições dos elementos do sistema serão posteriormente empregadas para melhorar o desempenho do teste.

ABSTRACT

CLONING, EXPRESSION, PURIFICATION AND ENZYMATIC EVALUATION OF METALLO- β -LACTAMASE TYPE NDM FOR STANDARTIZATION OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST

NDM-producing bacteria are a serious public health problem. These pathogens have a multiresistant profile and cause difficult to treat hospital infections, leaving few therapeutic options available and culminating in high mortality rates. Additionally, different bacterial species have already been identified as producing NDM, indicating a great potential for dissemination of this resistance determinant. The World Health Organization recommends the implementation of resistance control and prevention strategies through the development of simple and rapid diagnostic tests. In this context, the objective of this study was the cloning, expression, purification and enzymatic evaluation of the metallo-beta-lactamase type NDM aiming the standardization of an immunochromatographic test for the detection of NDM-producing bacteria. For achieving this goal, cloning and expression of the *bla*_{NDM} gene from a *K. pneumoniae* strain were carried out, followed by purification of rNDM and rabbit immunizations with the rNDM adsorbed to aluminum hydroxide to obtain anti-rNDM polyclonal serum. We also evaluated the potential of the polyclonal antibody to detect rNDM and NDM-producing bacteria by ELISA and lateral flow immunochromatography. The polyclonal antibody by ELISA showed a 100% of specificity and sensitivity. The standardized immunochromatographic test was also able to detect both rNDM and the native protein in clinical isolates in a specific fashion. The results obtained in this study showed that polyclonal anti-rNDM antibody has potential to be used in the diagnosis of NDM-producing bacteria. Strategies such as the use of monoclonal antibodies in combination with polyclonal and the evaluation of other conditions of system elements will be employed to improve the test performance.

I. INTRODUÇÃO

1.1. Cenário atual da resistência bacteriana aos antimicrobianos

A disseminação de bactérias multirresistentes é considerada uma séria ameaça à saúde da população, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade (OMS, 2012; CDC, 2013). A pressão seletiva ocasionada pelo uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos é um dos fatores mais relevantes para a resistência, sendo o cenário bastante agravado pelo fato de os antibióticos não serem utilizados somente para tratamento de seres humanos, mas sendo empregado de forma abusiva como promotores de crescimento e no controle, prevenção e tratamento de doenças em animais de pecuária (CDC, 2013; Laxminarayan, 2014). Também são considerados fatores importantes para a rápida disseminação de bactérias resistentes a plasticidade genômica das bactérias, que permite a transferência horizontal de determinantes de resistência, a ausência de medidas adequadas de controle de disseminação de bactérias multirresistentes, especialmente em países em desenvolvimento, e a facilidade de tráfego de pessoas entre diferentes países e continentes (OMS, 2012; Johnson & Woodford, 2013; Hawkey, 2015). Além disso, a constatação de que novos antimicrobianos não estão sendo desenvolvidos na mesma velocidade do surgimento de bactérias multirresistentes torna o cenário ainda mais grave (Laxminarayan, 2013, 2014).

Atualmente, o tratamento para muitas infecções corriqueiras ou complexas tem se tornado algo bastante difícil ou até mesmo inexistente, de modo que infecções que outrora eram de fácil tratamento, hoje estão sem opções terapêuticas (OMS, 2012). Nos Estados Unidos, aproximadamente 23 mil pessoas morrem por ano devido infecções causadas por micro-organismos resistentes. Enquanto que dois milhões de pessoas adoecem todo ano por infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos de escolha para tratamento (CDC, 2013).

Infecções causadas por micro-organismos resistentes geram grandes custos no setor da saúde, estando relacionadas com o aumento da morbidade, prolongamento do tempo de internação, maior risco de complicações e, o mais preocupante, a maior taxa de mortalidade. Segundo estimativas, custos relacionados ao tratamento de saúde devido a infecções resistentes a antimicrobianos estavam em torno de 20 milhões de dólares por ano somente nos Estados Unidos da América (EUA), enquanto que a estadia no hospital era de oito milhões de dias a

mais. Além dos impactos na saúde, a resistência aos antimicrobianos também gera impactos no setor econômico, como perda de produtividade de mão-de-obra e aumento de gasto em diagnóstico e tratamento (OMS, 2012, 2014; CDC, 2013). Não existem publicações na literatura ou dados oficiais acerca do impacto econômico das infecções por micro-organismos resistentes no Brasil.

As bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE), foram por muito tempo os principais micro-organismos associados às infecções relacionadas a assistência em saúde (IRAS) (Livermore, 2012). No entanto, a partir de 2006, foi observada uma mudança nesse cenário com a queda do número de infecções por MRSA em diferentes países europeus, como o Reino Unido (Wilson et al. 2011) e também nos Estados Unidos (Lee et al. 2011). Essa queda foi possivelmente provocada pela implementação de políticas de controle, assim como pelo aumento de infecções por patógenos Gram-negativos, que são reconhecidos pela sua maior diversidade e complexidade. Além disso, o ano de 2003 marcou a crescente dominância dos Gram-negativos, iniciada principalmente pelo rápido aumento da incidência de amostras positivas para β -lactamases de espectro estendido (ESBL) do tipo CTX-M (cefotaximases) (Mushtaq et al. 2003; Livermore, 2012).

A disseminação mundial de bactérias produtoras de ESBLs implicou no maior uso dos carbapenêmicos (Paterson, 2006; MacVane, 2016), que são antimicrobianos reconhecidos como a última opção de terapia contra patógenos Gram-negativos multirresistentes. A consequência do uso abusivo dos carbapenêmicos em terapias empíricas, aliado a outros fatores como, por exemplo, uso na pecuária e falta de saneamento básico, tornaram possíveis a seleção e disseminação de micro-organismos resistentes a esses antimicrobianos pelo mundo (Livermore, 2012).

A Assembléia Mundial de Saúde aprovou, em 2015, o Plano de Ação Global em Resistência Microbiana pela Assembléia Mundial de Saúde, incentivando os países membros a implementarem seus próprios planos nacionais para o combate, controle e vigilância da resistência microbiana (OMS, FAO & OIE, 2016). O cenário da resistência aos antimicrobianos no Brasil não está diferente do que é visto no mundo. Desta forma, o Brasil desenvolveu um Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde com o objetivo geral de diminuir a incidência de IRAS no país. O Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14 da ANVISA, que apresenta uma avaliação dos indicadores nacionais das IRAS e resistência microbiana do ano de 2015, mostra altas taxa

de resistência a oxacilina em cocos Gram-positivos (principalmente *Staphylococcus* sp.), aos carbapenêmicos em bacilos Gram-negativos não fermentadores (*Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*) e às cefalosporinas de amplo espectro em Enterobactérias, em UTI adulto (Figura 1.1) (ANVISA, 2015).

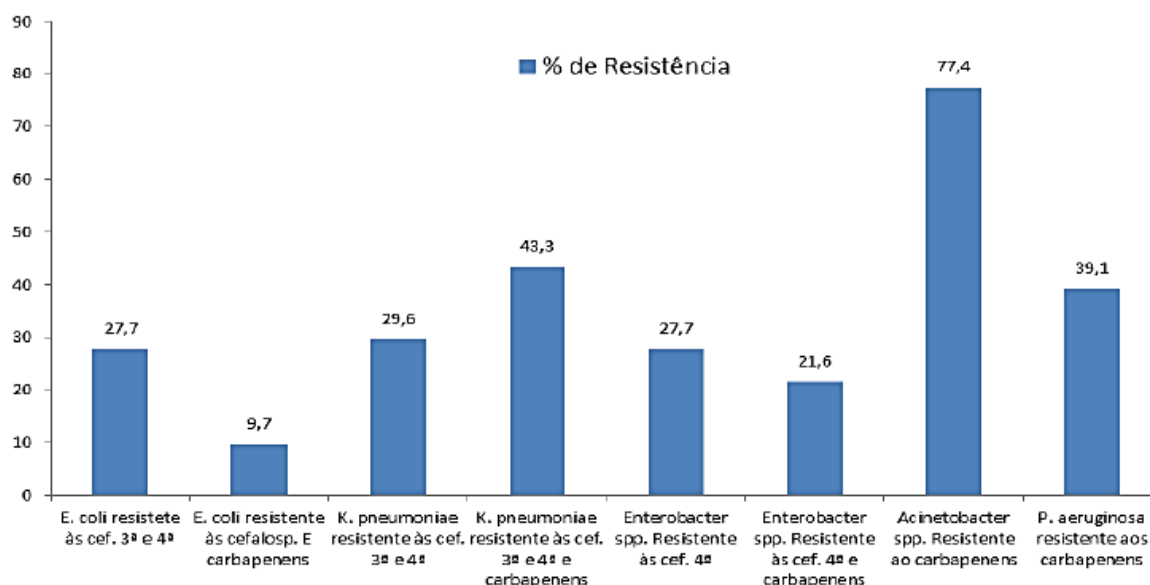


Figura 1.1: Porcentagem de fenótipos de resistência aos antimicrobianos em bacilos Gram-negativos mais detectados em infecções primárias de corrente sanguínea associadas à catéter venoso central em UTI adulto de hospitais brasileiros no ano de 2015. Adaptado de ANVISA (2015).

Um grupo de São Paulo publicou recentemente um artigo sobre a resistência microbiana aos β -lactâmicos e às polimixinas em *Enterobacteriaceae* no Brasil, onde frisou o aumento da disseminação de bactérias produtoras de β -lactamase presentes em plasmídeos nas últimas três décadas e salientou a importância da enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) em *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos como o mecanismo de resistência mais comum (Sampaio & Gales, 2016). Esse estudo, assim como o de Bonelli et al. (2014), que ressalta os altos níveis de resistência aos antimicrobianos na América do Sul quando comparados aos mundiais, demonstram a necessidade de maior controle de infecções por micro-organismos multirresistentes no país e a implementação de políticas de restrição de uso indevido de antimicrobianos (Bonelli et al. 2014; Sampaio & Gales, 2016).

1.2. Mecanismos de ação dos antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias químicas sintéticas ou naturais capazes de inibir o crescimento bacteriano (efeito bacteriostático) ou capazes de matar as bactérias (efeito bactericida). Os antimicrobianos naturais, conhecidos como antibióticos, são aqueles produzidos por micro-organismos. Os antibióticos naturais podem ser alterados quimicamente

para aumentar sua eficácia, sendo chamados de antibióticos semi-sintéticos. As propriedades essenciais de um antimicrobiano seriam: toxicidade seletiva, ou seja, a capacidade da droga de agir somente no alvo esperado; atuação em baixas concentrações; e ação bactericida (Madigan et al. 2010).

Existem diversos mecanismos pelos quais os antimicrobianos podem atuar, como: na organização da membrana citoplasmática; no processo de transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA); na replicação do DNA; na síntese de proteínas; na síntese do peptideoglicano e; no metabolismo do ácido fólico.

Dentre todos os antimicrobianos, os β -lactâmicos (que agem na síntese do peptideoglicano) ganham destaque como importantes opções terapêuticas pela sua grande diversidade em termos de propriedades químicas e farmacológicas (Livermore & Woodford, 2006), aliado à sua baixa toxicidade visto que seu alvo não é encontrado em organismos eucariotos, e pela sua fácil administração. O mecanismo de ação dos β -lactâmicos envolve a interrupção da transpeptidação (reação responsável pelo estabelecimento de uma ligação cruzada entre duas cadeias de peptideoglicano), através da ligação covalente do antimicrobiano a transpeptidases. A ausência da transpeptidação acarreta a formação de uma parede celular defeituosa e frágil, de forma que podem ocorrer rupturas da estrutura do peptideoglicano. Uma característica importante dessa classe de antimicrobianos seria sua atividade tempo-dependente, ou seja, necessitam que a bactéria esteja se multiplicando (fase exponencial do crescimento celular) para que possa ser efetivo, visto que é nesse momento em que ocorre a síntese do peptideoglicano. Os β -lactâmicos podem ser classificados em: (i) penicilinas, (ii) cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta geração (ex. cefotaxime, ceftriaxona, ceftazidime), (iii) carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) e (iv) monobactâmicos (ex. aztreonam) (Madigan et al. 2010; Pitout & Laupland, 2008; CDC, 2013).

1.3. Mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos

As bactérias são micro-organismos bastante versáteis, de forma que algumas podem ser naturalmente resistentes a determinados antimicrobianos ou podem adquirir mecanismos para sobrepujar a ação dessas drogas. A resistência bacteriana é um fenômeno ocasionado pela pressão de seleção, seja por forças naturais de evolução ou pela presença de antibióticos. Por exemplo, o uso exacerbado de β -lactâmicos para tratamento de infecções pode acarretar na seleção de cepas bacterianas resistentes no organismo do paciente que, sem a competição de outras cepas menos resistentes ou de bactérias pertencentes à microbiota, permite seu aumento populacional (Figura 1.2) (Baym et al. 2016). Esse cenário torna o caso do paciente bastante

complicado, pois antibióticos considerados de primeira linha para o tratamento já não serão mais eficazes (CDC, 2013; Boyle & Zembower, 2015).

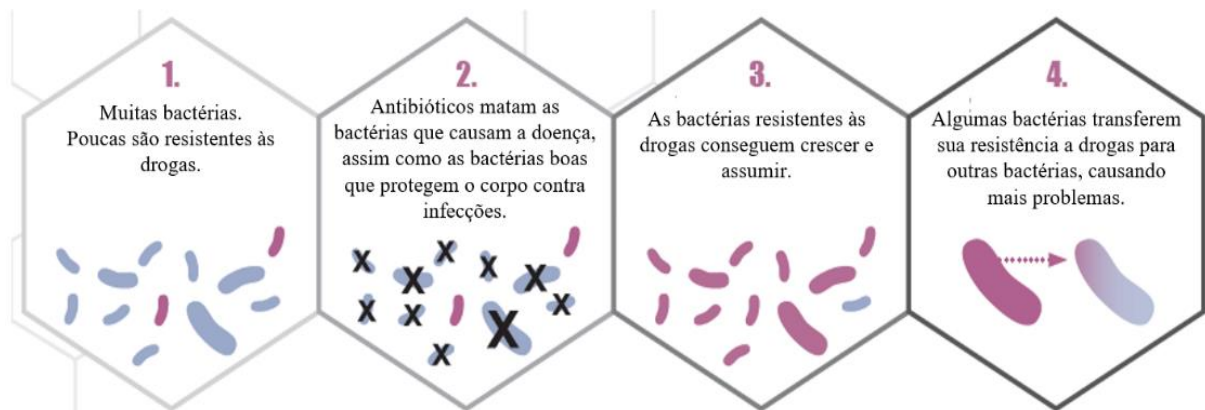


Figura 1.2: Processo de seleção de cepas bacterianas resistentes pela pressão seletiva ocasionada pelos antimicrobianos. (1) Presença de bactérias, sendo poucas delas resistentes a drogas. (2) O antimicrobiano promove uma pressão de seleção, de forma que somente as bactérias resistentes sobrevivem. (3) Com a baixa taxa de competição, bactérias resistentes conseguem se multiplicar e dominar aquele ambiente. (4) Algumas cepas bacterianas conseguem transferir seus determinantes de resistência para outras bactérias, deixando o cenário mais complicado. Adaptado de CDC (2013).

As bactérias podem ser naturalmente resistentes a determinados antimicrobianos devido a fatores inerentes a sua estrutura ou função. Por exemplo, bactérias Gram-negativas possuem resistência intrínseca à glicopeptídeos como a vancomicina visto que o composto não consegue atravessar a membrana externa desses organismos (Tsuchido & Takano, 1988).

Por outro lado, as bactérias podem se tornar resistentes aos antimicrobianos através de diferentes mecanismos. Um destes mecanismos seria dificultar a entrada e permanência do antimicrobiano na célula através de modificações na expressão ou estrutura de porinas ou pela ação de bombas de efluxo. A dificuldade de penetração e a expulsão excessiva do antimicrobiano interferem na sua ação haja vista sua baixa concentração na célula (Blair et al. 2015; Fair & Tor, 2014). *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* são exemplos de micro-organismos em que foi detectada a resistência aos carbapenêmicos mesmo sem produção de carbapenemases, devido a ausência ou mutações nos genes codificantes para porinas da membrana externa e/ou atividade de bombas de efluxo, aliada à ação conjunta de ESBLs (Baroud et al. 2013). Tanto o efluxo ativo como alteração nas porinas podem conferir resistência de baixo nível a várias classes de antimicrobianos.

A inativação enzimática é um dos mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos mais eficazes e disseminados (Bush et al. 1995; Bush, 2010; Blair et al. 2015). Um dos métodos de inativação enzimática envolve alteração da estrutura química do antimicrobiano. Um exemplo deste tipo de ação enzimática são as enzimas modificadoras de

aminoglicosídeos (EMAs). Estes antimicrobianos são bastante suscetíveis a modificações devido a seus grupamentos hidroxil e amida serem bastante propensos a inativação por EMAs como as acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases (Norris & Serpersu, 2013). A inativação enzimática por hidrólise pode ser exemplificada pela produção de β -lactamases, como a KPC, capaz de promover a hidrólise da ligação amida do anel β -lactâmico de todos os antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos, como carbapenêmicos e cefalosporinas de espectro estendido, tornando-os incapazes de interferir na síntese do peptidoglicano (Blair et al. 2015).

1.4. β -lactamases

Em bacilos Gram-negativos, a inativação enzimática por hidrólise é o mecanismo mais comum de resistência aos antimicrobianos (Bush & Jacoby, 2010). As β -lactamases são enzimas bastante versáteis que podem hidrolisar diferentes subclasses de β -lactâmicos (Blair et al. 2015).

Desde a descrição da primeira β -lactamase, a penicilinase, em 1940, diversas enzimas capazes de hidrolisar os β -lactâmicos têm sido identificadas (Abraham & Chain, 1988). A incidência de micro-organismos como *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de β -lactamases do tipo SHV-1 e TEM-1 capazes de hidrolisar as drogas existentes na década de 80 e sua disseminação para outras espécies, levou ao desenvolvimento das cefalosporinas de terceira geração, que ganharam bastante destaque no tratamento de pacientes infectados com patógenos produtores dessas enzimas. No entanto, logo detectou-se enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração e aztreonam, sendo chamadas de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) (Paterson & Bonomo, 2005). Bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são as principais produtoras de ESBLs como CTX-M14 e CTX-M15, com destaque para as espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* (Pitout & Laupland, 2008). As ESBLs são enzimas de grande relevância clínica e podem ser divididas em diferentes classes, sendo as principais SHV, TEM, CTX-M e oxacilinases (OXA) (Jacoby & Munoz-Price, 2005).

1.5. Carbapenemases

Com a disseminação das ESBLs, houve um aumento do uso de carbapenêmicos, sendo essa subclasse considerada frequentemente como os antimicrobianos de última escolha empregados para tratamento de bactérias produtoras de ESBLs no ambiente hospitalar (Livermore, 2012). Porém, o uso exarcebado dos carbapenêmicos estimulou a maior

disseminação de enzimas capazes de clivá-los, as carbapenemases. Essas enzimas são consideradas as mais versáteis β -lactamases existentes devido a seu espectro de ação ampliado, sendo capazes de hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos. Genes codificantes de carbapenemases podem estar presentes tanto no cromossomo quanto em plasmídeos (Nordmann & Poirel, 2002; Livermore & Woodford, 2006; Queenan & Bush, 2007).

Os primeiros relatos acerca de resistência aos carbapenêmicos pela produção de carbapenemases ocorreram em bacilos Gram-negativos não-fermentadores. Porém, a maior preocupação se concentra nas Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, pois estão mais relacionadas a infecções clínicas do que os não-fermentadores, além de carregarem maior diversidade de carbapenemases (Livermore, 2012).

A existência de patógenos resistentes aos carbapenêmicos, principalmente pela produção de carbapenemases, é um problema gravíssimo devido à: (i) escassez de opções terapêuticas, restando apenas drogas com maior toxicidade, como a colistina e tigeciclina; (ii) disseminação em diferentes espécies bacterianas; (iii) variedade dos tipos de enzimas (ex: KPC, NDM - Nova Déli metalo- β -lactamase, SPM - São Paulo metalo- β -lactamase, VIM - *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase* e IMP – imipenemase); (iv) e capacidade de acumular diversos mecanismos de resistência, gerando um perfil multirresistente (Poirel et al. 2007; Cornaglia et al. 2011; Livermore, 2012). Ausência ou limitação de opções terapêuticas e/ou a demora para a administração dos antimicrobianos adequados são fatores decisivos para a alta taxa de mortalidade de pacientes com infecções por Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERC), principalmente por *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Segundo estimativas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em 2013, ERCs são responsáveis por quase 9 mil casos de infecção por ano nos EUA, sendo que destes, seiscentos pacientes não conseguem sobreviver. Além disso, aproximadamente metade dos pacientes com septicemia ocasionada por ERC vão a óbito nos hospitais americanos. Devido a gravidade das infecções causadas por ERC, o CDC incluiu esses patógenos no grupo de nível de ameaça “Urgente”, ao lado de *Clostridium difficile* e *Neisseria gonorrhoeae* resistentes (CDC, 2013). O estudo realizado por Patel e colaboradores (2008) para avaliação do impacto de infecções da corrente sanguínea por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos também indicou a alta taxa mortalidade de pacientes durante o período de 2004 a 2006 em um hospital de Nova York. Resultados semelhantes foram obtidos por Ben-David no ano de 2006 em Israel (Ben-David et al. 2012).

As β -lactamases podem ser divididas em quatro classes de acordo com a similaridade da cadeia de aminoácidos pela classificação de Ambler (Ambler, 1980). As enzimas de classe A têm como característica principal a presença do resíduo serina em seu sítio ativo. Exemplos de integrantes da classe A seriam a KPC e GES; a classe B engloba as metalo- β -lactamases, enzimas que necessitam de cátions divalentes como co-fatores enzimáticos, como por exemplo SPM, VIM, IMP e NDM; na classe C está a enzima AmpC, que também possui uma serina no seu sítio ativo, sendo seu gene codificante frequentemente encontrado no cromossomo bacteriano; e, por último, existe a classe D, grupo pertencente às oxacilinasas de espectro estendido com serina em seu sítio ativo. Até o momento, apenas as classes A, B e D possuem enzimas com atividade carbapenemase (Queenan & Bush, 2007; Bush & Jacoby, 2010, Bush & Fisher, 2011; Cornaglia et al. 2011).

1.6. Metallo- β -lactamases

As metalo- β -lactamases são conhecidas pela sua capacidade de hidrolisar todos os β -lactâmicos, exceto o aztreonam, e por serem inibidas por quelantes de íons divalentes como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Enzimas dessa classe ganham destaque por possuírem uma atividade hidrolítica potente sobre os carbapenêmicos, por estarem codificadas em plasmídeos e por serem resistentes a todos os inibidores de β -lactamases disponíveis para terapia (Queenan & Bush, 2007; Cornaglia et al. 2011). Apesar de as metalo- β -lactamases não serem capazes de hidrolisar o aztreonam, o composto dificilmente poderia ser utilizado para terapia, visto que os micro-organismos produtores desta enzima carregam outros determinantes de resistência que prejudicam a sua eficiência (Cornaglia et al. 2011).

Segundo o Alerta N° 01/2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2011), cepas produtoras de metalo- β -lactamases estão frequentemente associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, com opções terapêuticas bastante limitadas. Adicionalmente, a frequência com que os genes codificantes de metalo- β -lactamases são encontrados em plasmídeos, elementos genéticos móveis que podem carrear determinantes de resistência entre diferentes espécies bacterianas, permite uma maior disseminação dessas enzimas, implicando em um grande impacto epidemiológico.

As metalo- β -lactamases emergiram no contexto mundial na década de 90 (Walsh et al. 2005) e, desde a descoberta da primeira metalo- β -lactamase, a BcII isolada de *Bacillus cereus*, esse grupo de enzimas hidrolíticas tem se tornado uma ameaça global ao aumento da resistência a antibióticos, que se agrava ainda mais pelo aparecimento e rápida disseminação da metalo- β -

lactamase do tipo NDM em bactérias com perfil de multirresistência (Llarrull et al. 2007; Johnson & Woodford, 2013).

1.7. NDM

NDM é uma das carbapenemases de maior importância clínica atualmente (Dortet et al 2014a). A enzima pertence à superfamília das metalo- β -lactamases. O gene codificante da enzima, o *bla*_{NDM}, é frequentemente encontrado em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, mas também já foi descrito no cromossomo bacteriano (Young, 2009; Nordmann et al. 2011a).

NDM é uma enzima bastante singular no grupo das metalo- β -lactamases haja vista a sua baixa similaridade com as outras enzimas pertencentes à mesma classe. VIM-1 e VIM-2 são as enzimas com as quais foi encontrada maior similaridade de aminoácidos (~ 33%) com NDM. Diferentemente das outras enzimas pertencentes à superfamília das metalo- β -lactamases, a NDM possui aminoácidos distintos em seu sítio ativo, o que sugere uma estrutura tridimensional única (Young, 2009).

O gene *bla*_{NDM-1}, referente a primeira variante de NDM descoberta, possui 807 nucleotídeos que codificam uma proteína de 269 aminoácidos, com um peptídeo sinal nas primeiras bases, com massa molecular de aproximadamente 28 kDa. Experimentos de gel filtração e espectrometria de massa sugerem que a proteína esteja na forma de monômero durante o exercício de sua atividade enzimática (Young, 2009).

NDM é uma proteína associada a lipídeos que se encontram ancorados no folheto interno da membrana externa de bacilos Gram-negativos. Essa enzima possui em seu sítio ativo duas regiões para ligação de íons Zn^{+2} , necessários para sua atividade biológica (Yoshizumi, 2013). Devido à sua localização na membrana, a NDM possui maior estabilidade em relação às outras metalo- β -lactamases. Além disso, seu ancoramento facilita a liberação da enzima no interior de vesículas de membrana externa (*Outer membrane vesicles* – OMVs) (González et al. 2016). Estudos de cristalografia evidenciaram que a NDM é composta por quatro camadas $\alpha/\beta/\beta/\alpha$ que se apresentam no formato sanduíche. Adicionalmente, estruturas de cristal de NDM-1 apresentaram um sítio ativo mais largo e flexível, capaz de se ligar diferentes tipos de β -lactâmicos, o que pode justificar seu amplo espectro de ação (Kim et al. 2011).

Desde a primeira identificação de NDM em 2008 (Young, 2009), dezesseis variantes dessa enzima foram descritas e publicadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (FN396876, JF703135, JQ734687, JQ348841, JN104597, JN967644, JX262694,

AB744718, KC999080, KF361506, KP265939, AB926431, LC012596, KM210087, KP735848, KP862821). Poucas mutações pontuais podem ser observadas entre elas, como a variante NDM-2, que apresenta uma substituição de citosina por guanina na posição 82, resultando na troca do aminoácido prolina por uma alanina na posição 28 em relação às enzimas da mesma subclasse (Figura 1.3). As variantes NDM-4, NDM-5 e NDM-7 são conhecidas pelo seu maior poder hidrolítico, possivelmente devido a uma mutação pontual na posição 460 que resulta na troca do aminoácido metionina por uma leucina (Hornsey et al. 2011; Göttig, 2013; Nordmann et al. 2012b), diferente das outras variantes cujas mutações resultam em metionina ou valina. Como NDM-8, NDM-12, NDM-13 e NDM-15 também possuem a mesma mutação pontual gerando uma leucina, estima-se que elas também estejam incluídas no grupo das enzimas com capacidade hidrolítica mais forte. No entanto, a variante NDM-1 ganha destaque devido à sua maior incidência e disseminação em casos de infecção clínica (Kaase et al, 2011; Dortet et al, 2014a; Zmarlicka et al. 2015).

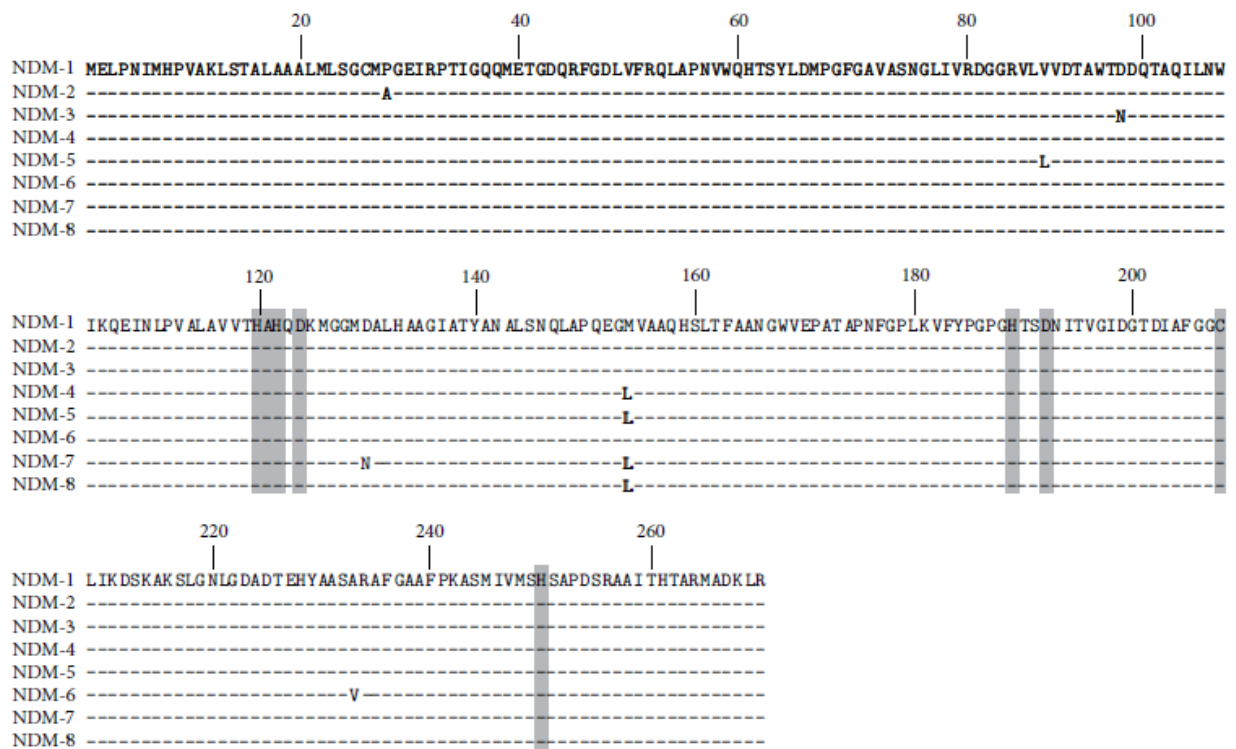


Figura 1.3: Alinhamento da sequência de aminoácidos de oito variantes de NDM. Partes destacadas em cinza correspondem ao sítio ativo das enzimas. Adaptado de Dortet et al (2014a).

NDM-1 foi detectada pela primeira vez na Suécia em 2008, em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada de uma infecção urinária, em um paciente de origem indiana que havia sido internado anteriormente em um hospital de Nova Déli, Índia. A identificação de uma *E. coli* carregando um plasmídeo contendo o gene *bla*_{NDM-1} com perfil de susceptibilidade similar ao

encontrado no de *K. pneumoniae*, isolada de amostras de fezes do mesmo paciente foi um indicativo da facilidade de disseminação desse determinante de resistência (Young, 2009).

A facilidade pela qual o gene *bla_{NDM}* pode se disseminar em diferentes espécies bacterianas, principalmente *K. pneumoniae*, um típico patógeno hospitalar, e *E. coli*, uma bactéria frequentemente associada a infecções adquiridas na comunidade, aliado ao fato de estar frequentemente associado a outros mecanismos de resistência, tornam o cenário um verdadeiro pesadelo (Young, 2009; Nordmann et al. 2011b; Blair et al. 2015). O gene *bla_{NDM}* tem sido relatado em diferentes espécies de bacilos Gram-negativos, especialmente nos microorganismos da família *Enterobacteriaceae*, como *Klebsiella* sp., *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morgannii*, *Providencia* sp., *Proteus* sp. e *Enterobacter* sp., mas também já foram identificados produtores de NDM em bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose, como *Acinetobacter* spp. e, mais raramente, em *P. aeruginosa*, demonstrando seu alto poder de disseminação (Nordmann et al. 2011a).

Um fato bastante interessante e único acerca NDM seria o fato de sua grande disseminação não estar relacionada com um plasmídeo específico ou um único clone epidêmico (Nordmann et al. 2011b; Blair et al. 2015), como é visto em KPC, cuja dispersão no Brasil está relacionada bactérias produtoras da enzima pertencentes ao ST 11 (Pereira et al. 2013). Essa característica também foi demonstrada em estudo recente de epidemiologia molecular, em que a transposição do cassete do gene *bla_{NDM-1}* para diferentes plasmídeos foi revelada como o principal mecanismo para a disseminação global do gene, seguida pela conjugação de plasmídeos carreadores de *bla_{NDM-1}* e da disseminação de espécies bacterianas produtoras de NDM (Khong et al. 2016).

Os patógenos produtores de carbapenemase do tipo NDM tem sido motivo de grande alarme, haja vista terem sido identificados a partir de diferentes tipos de infecções hospitalares, como septicemia, peritonites, infecção urinária, pulmonar, de tecidos moles e associadas a dispositivos médicos, acarretando em altos índices de mortalidade de pacientes. Devido à produção de NDM, o tratamento de infecções tanto hospitalares quanto comunitárias (Borah et al. 2016; van der Mee-Marquet et al. 2016; Janelle et al. 2016) fica limitado a poucas opções, como colistina, polimixinas, fosfomicina e tigeciclina, que podem ser mais tóxicos para o paciente (Young, 2009; Bush, 2010; Bush & Fisher, 2011; CDC, 2013; Dortet et al. 2014a). Adicionalmente, bactérias produtoras de NDM com perfil pan-resistente estão sendo um desafio cada vez mais comum em hospitais (Young, 2009; CDC, 2013).

Desde a primeira descrição em 2008, NDM tem sido identificada em diferentes partes do mundo. Um estudo realizado com amostras de isolados de *Enterobacteriaceae* de diferentes pontos da Índia, Bangladesh e Paquistão revelou a disseminação geográfica de NDM-1 nessas regiões (Kumarasamy et al. 2010). Na Europa, um laboratório de referência também detectou diferentes espécies de Gram-negativos produtores de carbapenemase do tipo NDM-1 isoladas a partir de diferentes tipos de infecção sendo que a grande maioria dos pacientes possuía histórico de viagens para Índia e Paquistão (Nordmann et al. 2011a).

A maioria dos estudos associavam a detecção de NDM à viagens a Índia e Paquistão. Entretanto, estudos posteriores mostraram que alguns pacientes carregando patógenos produtores de NDM no Reino Unido e Paquistão não tinham histórico recente de hospitalização após viagens a Índia. A subsequente detecção do gene *bla_{NDM-1}* em amostras de água para consumo humano e no esgoto de Nova Déli mostrou o risco que a população local está submetida, haja vista a pobre política de saneamento básico e de água do país indiano. Além disso, a identificação do gene em espécies ainda não descritas anteriormente como carreadoras, como *Aeromonas caviae*, *Vibrio cholerae* e *Shigella boydii* demonstrou mais uma vez o alto poder de disseminação de *bla_{NDM}* (Walsh et al. 2011). No Brasil, um estudo de monitoramento de bactérias resistentes aos antimicrobianos em águas de recreação identificou a presença de uma *K. pneumoniae* produtora de NDM-1, suscetível somente a colistina, na praia do Flamengo (Rio de Janeiro), em 2013, sendo mais uma indicação da problemática da disseminação dessa ameaça para a comunidade (Campana et al. 2017).

Um estudo de vigilância global de Monitoramento de Tendências na Resistência aos Antimicrobianos (*Monitoring Antimicrobial Resistance Trends - SMART*) avaliou bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos isoladas de infecções urinárias e intra-abdominais durante o período de 2008-2012 e detectou a presença de 134 isolados de *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter* sp. produtores de NDM em diferentes países, como Guatemala, EUA, Filipinas, Sérvia, Vietnã e Oriente Médio, sendo a grande maioria dos isolados provenientes da Índia (Biedenbach et al. 2015). Outros grupos de pesquisa também já relataram a presença de micro-organismos produtores de NDM em outras partes do mundo (Dortet et al 2014a) como, por exemplo, no Japão (Mizuno et al. 2014), Austrália (Poirel et al. 2010), Holanda (Halaby et al. 2012) e Egito (Gamal et al. 2016) (Figura 1.4).

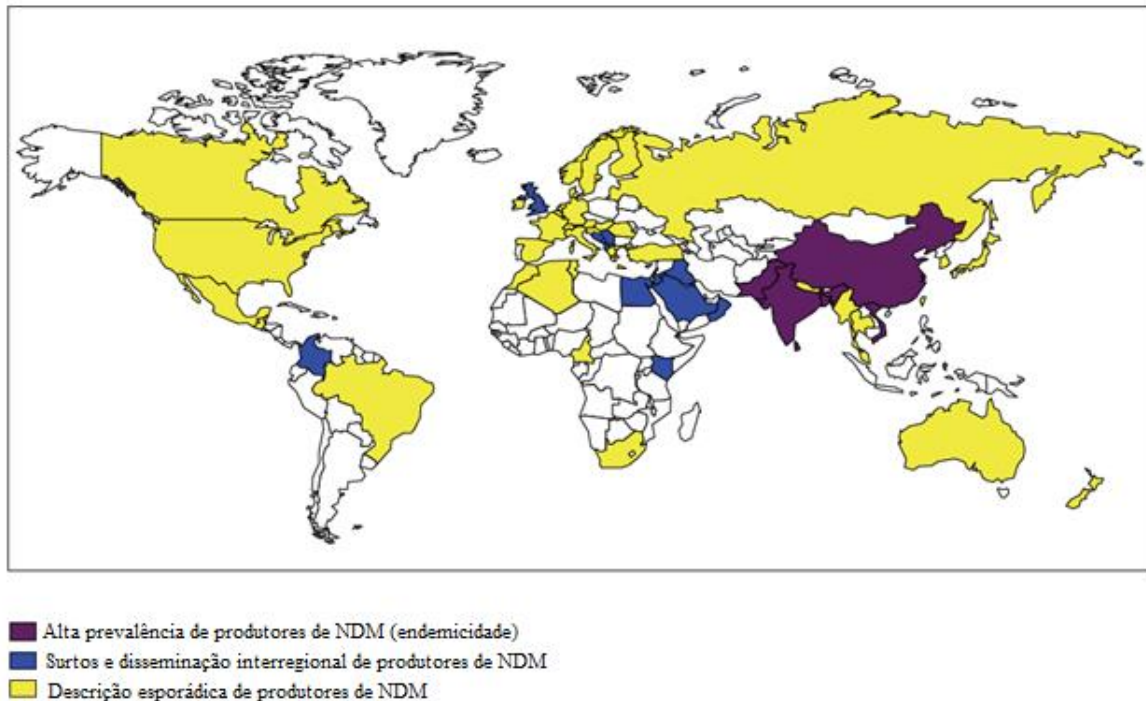


Figura 1.4: Distribuição geográfica de bactérias produtoras de NDM no mundo. Adaptado de Dortet et al (2014).

Além disso, um estudo retrospectivo analisando amostras de *Enterobacteriaceae* isoladas na Índia entre os anos de 2006-2007, revelou que esses patógenos estavam circulando na região dois anos antes do primeiro relato de NDM em 2008 (Castanheira et al. 2011).

Na América Latina e Caribe também há relatos de identificação de micro-organismos produtores de carbapenemase do tipo NDM (Escandón-Vargas et al. 2016) (Figura 1.5), como na Guatemala (Pasteran et al. 2012), Colômbia (Escobar Pérez et al. 2013), Paraguai (OPAS/OMS, 2012), Honduras (Waterman et al. 2013), México (Barrios et al. 2013) e Argentina (Pasteran et al. 2014). Sendo a primeira descrição do gene *bla_{NDM}* no continente publicada em 2012, proveniente de uma amostra de *Providencia rettgeri* isolada de um paciente uruguaio (OPAS/OMS, 2012).

No Brasil, o primeiro relato de uma bactéria produtora de NDM-1 ocorreu no Rio Grande do Sul em 2013, a partir do isolamento de uma *P. rettgeri* de amostra de tecidos moles de um paciente internado com doença periferal vascular e infecção nos pés por diabetes. A cepa de *P. rettgeri* encontrada possuía resistência intrínseca a polimixina B e apresentava susceptibilidade intermediária a tigeciclina, que são frequentemente as poucas drogas efetivas para tratamento de patógenos resistentes a carbapenêmicos, de forma que determinar uma opção de terapia seria bastante complexo (Carvalho-Assef et al. 2013).

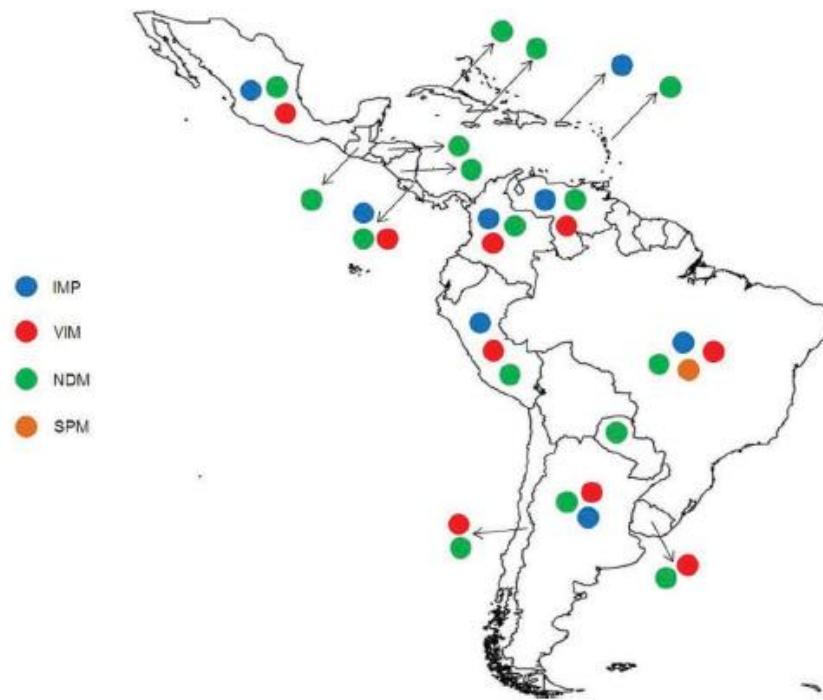


Figura 1.5: Distribuição de metalo- β -lactamases na América Latina e Caribe. Adaptado de Escandón-Vargas et al (2016).

No ano seguinte (2014), um estudo retrospectivo de amostras bacterianas resistentes a carbapenêmicos estocadas durante o período de 2012 a 2013 foi realizado no mesmo hospital onde foi relatado o primeiro caso de NDM-1 no Brasil. A partir desse estudo, cinco *Enterobacter hormaechei* positivos para NDM-1 foram identificados de *swab* retal de pacientes assintomáticos, enquanto que um foi isolado a partir de uma pia, o que implica que NDM-1 pode estar mais disseminada no país do que se pensou anteriormente (Carvalho-Assef et al. 2014). Também em 2014, um grupo de pesquisa detectou nove isolados do complexo *Enterobacter cloacae* e duas *M. morgannii* carreadores de bla_{NDM-1} , durante o período de sete meses, provenientes de três hospitais da cidade de Porto Alegre. A disseminação de carbapenemase do tipo NDM-1 em *M. morgannii* é de grande preocupação devido a sua resistência intrínseca a polimixinas e tigeciclina (Rozales et al. 2014).

No Rio de Janeiro, três cepas de *E. cloacae* e uma de *P. rettgeri* produtoras de NDM-1 foram identificadas entre setembro e outubro de 2013 provenientes de quatro hospitais diferentes. A presença de associação entre bla_{NDM-1} e bla_{KPC-2} , assim como entre bla_{NDM-1} e o gene codificante de uma metilase (resistência a aminoglicosídeos) em isolados de *E. cloacae* que não apresentavam relacionamento genético, demonstra mais uma vez a capacidade das bactérias de acumular diferentes determinantes de resistência e, também, sugere uma rápida disseminação de NDM no ambiente hospitalar brasileiro (Quiles et al. 2015).

NDM-1 também foi identificada em Gram-negativos não fermentadores como em *A. baumannii* no estado do Paraná (Pillonetto et al 2014), *Acinetobacter pittii* no Rio Grande do Sul (Pagano et al. 2015) e *Acinetobacter berezeniae* em Santa Catarina, sendo um problema bastante sério visto que a detecção de *bla*_{NDM-1} em plasmídeos de espécies de *Acinetobacter* raramente relacionados a infecções clínicas indica sua função como reservatório de determinantes de resistência (Gomes-Chagas et al. 2015).

Apesar de KPC ser a carbapenemase mais disseminada no Brasil (Sampaio & Gales, 2016), a presença de NDM não é um evento a ser subestimado. Estudos realizados pelo nosso laboratório (LAPIH) e por outros grupos brasileiros sugerem que a NDM se disseminou para diferentes estados do país, como no Rio de Janeiro (Quiles et al. 2015; Aires et al. 2017), Rio Grande do Sul (Carvalho-Assef et al. 2013, 2014), Paraná (Pillonetto et al. 2014), Santa Catarina (Gomes-Chagas et al. 2015), Distrito Federal (Faria-Junior et al. 2017) e São Paulo (Carmo Junior et al. 2015).

1.8. Importância do diagnóstico de bactérias produtoras de NDM

No ano de 2001, uma iniciativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) chamada *Global strategy for containment of antimicrobial resistance* apresentou cinco estratégias que deveriam ser executadas para a contenção da resistência aos antimicrobianos, prezando em questões regulatórias e incentivando inovações. Dentre os tópicos abordados, pode-se citar a vigilância no uso de antimicrobianos e na resistência haja vista que dados acerca da resistência local de um patógeno poderia facilitar a escolha do tratamento; a regulação e uso racional dos antimicrobianos para evitar seu uso indevido e desnecessário; maior consistência na regulação e controle do uso de antimicrobianos na pecuária; incentivo aos governos locais na implementação de medidas de ação efetivas. Por fim, as mais relevantes estratégias abordadas consistiam no controle e prevenção das infecções, destacando a necessidade de inovações e novas tecnologias no campo de diagnóstico com o emprego de testes rápidos e simples, descritos como de alta importância para evitar a disseminação de bactérias multirresistentes (OMS, 2001).

Segundo Escandón-Vargas e colaboradores (2016), o aumento de relatos de bactérias produtoras de carbapenemases na América Latina e no Caribe, principalmente no Brasil, Colômbia, Argentina e México, indicam uma grande disseminação dessas enzimas e a possibilidade de alguns países serem endêmicos. Devido à dificuldade de erradicação de patógenos produtores de NDM e pela presença de espécies bacterianas produtoras de carbapenemase no Brasil, grupos de pesquisa também ressaltaram a necessidade de medidas de

controle para evitar sua disseminação (Carvalho-Assef et al. 2013; Dortet et al. 2014a; Escandón-Vargas et al. 2016). Uma alternativa ideal para evitar a disseminação de NDM seria o rápido diagnóstico de pacientes colonizados ou com infecções ocasionadas por esses patógenos produtores de carbapenemase do tipo NDM, o que permitiria a implantação imediata de medidas de controle e isolamento, assim como guiaria o corpo médico acerca da melhor opção de tratamento (Nordmann et al. 2011b; Dortet et al. 2014a; Laxminarayan, 2014; Escandón-Vargas et al. 2016).

Nos EUA, há disponível o antimicrobiano ceftazidima/avibactam para tratamento de pacientes com infecções causadas por bactérias produtoras de KPC. A presença do avibactam potencializa a ação da ceftazidima, através da proteção do β -lactâmico da ação das β -lactamases. No entanto, o avibactam só possui capacidade de inibir enzimas da classe A, C e algumas pertencentes a classe D, ou seja, não é eficaz quando a resistência é mediada por NDM (Levasseur et al. 2015). Portanto, a disponibilidade dessa opção terapêutica reforça a necessidade diferenciação da carbapenemase presente na cepa bacteriana.

1.9. Métodos diagnósticos para detecção de bactérias produtoras de carbapenemases

A sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos pode ser verificada através de testes de disco-difusão em ágar ou por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano através de diluições seriadas do antimicrobiano em caldo ou ágar.

No entanto, os métodos citados acima, determinam se o agente infeccioso é suscetível, resistente ou se possui suscetibilidade intermediária ao antimicrobiano testado e não especificam qual o mecanismo de resistência. Em relação à resistência aos carbapenêmicos não é possível identificar se a amostra é ou não produtora de carbapenemases. Além disso, deve-se ressaltar que algumas cepas produtoras de NDM podem ser suscetíveis aos carbapenêmicos de acordo com os pontos de corte atuais. Assim, técnicas adicionais devem ser empregadas para a detecção de carbapenemases, pois é de grande importância a identificação destes mecanismos mesmo com CIM baixa para carbapenêmicos para controle de disseminação da resistência (Patel et al. 2009; Dortet et al. 2014a).

O Teste de Hodge Modificado é uma técnica bastante utilizada para detecção de produtores de carbapenemases por ser um teste barato e de fácil execução (CLSI, 2013; Patel et al. 2009; Dortet et al. 2014a), mas possui algumas desvantagens como: baixa sensibilidade para detecção de bactérias NDM positivas, como *M. morgani* (Rozales et al. 2014), *Providencia stuartii* (Girlich et al. 2011) e *A. baumannii* (Bonnin et al. 2012); somente

apresenta resultados após 72h (Rozales et al. 2014; Dortet et al. 2014a); e bactérias produtoras de CTX-M-15 com perda de porinas podem dar resultados falso positivos (Girlich et al. 2011). A detecção da presença de carbapenemases por hidrólise de carbapenêmicos pode ser realizada através de espectrometria por ultravioleta (UV), um método de baixo custo e com alta sensibilidade e especificidade (Bernabeu et al. 2012), mas tem como desvantagem a necessidade de tempo para processamento e de pessoal qualificado para operação (Dortet et al. 2014a; Nordmann et al. 2011b). Outra técnica que também identifica a produção de carbapenemases pela sua atividade é a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF), sendo altamente específica e sensível e de processamento rápido (Burckhardt & Zimmermann, 2011), mas que também exige microbiologistas treinados e uma maquinaria custosa (Dortet et al. 2014a).

O teste Carba NP (*in house*), que detecta rapidamente a produção de carbapenemases a partir da cultura microbiana, por alteração de cor no indicador de pH após hidrólise de imipenem, obteve sucesso na detecção de todas as bactérias produtoras de carbapenemases sendo 100% específico (Nordmann et al. 2012a) e uma versão pronta para uso (RAPIDEC® Carba NP Test) mostrou-se adequado para a rotina laboratorial apresentando boa sensibilidade e especificidade. Estes testes exigem grande quantidade de massa bacteriana, o tempo para leitura pode variar de 15 min a 2h (Poirel e Nordmann, 2015) e podem apresentar dificuldade de leitura dos resultados devido a diferentes percepções de cores. Adicionalmente, o teste Carba NP não é eficiente para detectar amostras carreadoras de *bla*_{OXA-48-like} (Cunningham et al. 2017) nem *P. mirabilis*, *P. stuartii* e *P. rettgeri* produtores de NDM (Maurer et al. 2014), apresentando resultados falso-negativos.

Todos os métodos anteriores detectam a presença de uma carbapenemase, mas não indicam a sua classe. Para este fim, existem técnicas que se baseiam na utilização de inibidores de beta-lactamases, como o teste de disco-difusão em ágar para a detecção da produção de metalo- β -lactamases pelo uso em conjunto de um disco contendo o carbapenêmico e outro contendo carbapenêmico com um inibidor da classe B, como o EDTA. Apesar de ser simples, a técnica de disco-difusão é demorada e não consegue detectar bactérias com baixa expressão de metalo- β -lactamases (Dortet et al. 2014a; Nordmann et al. 2011b). A fita de Etest para metalo- β -lactamases é um teste frequentemente empregado para determinação da CIM para carbapenêmicos e possui o mesmo princípio do método anterior, com um gradiente de imipenem em uma ponta e, na outra, um gradiente de imipenem com EDTA, sendo um teste com 94% de sensibilidade e 95% de especificidade (Walsh et al. 2002). No entanto, também

possui a desvantagem de não ser capaz de identificar cepas com baixo valor de CIM para carbapenêmicos (Dortet et al. 2014a).

Nenhum dos métodos descritos até o momento tem o poder de discriminar produtores de NDM especificamente. Por sua vez, a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e a qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa) são técnicas moleculares capazes de identificar a presença do gene *bla*_{NDM} no DNA das amostras bacterianas (Ong et al. 2011). Ambas as técnicas são reconhecidas pela sua alta sensibilidade e pelo alto poder discriminatório, todavia as desvantagens incluem a não detecção de carbapenemases ainda não descritas, equipamentos mais onerosos, exigência de pessoas treinadas para operação (Dortet et al. 2014a), além do fato que não necessariamente a presença do gene indicar que o mesmo esteja sendo expresso pela bactéria.

Levando em consideração as indicações e sugestões da OMS e de grupos de pesquisa (OMS, 2001; OMS, 2012; Carvalho-Assef et al. 2013; Dortet et al. 2014a), as desvantagens dos métodos atuais de diagnóstico de bactérias produtoras de carbapenemases/NDM (lentos ou relativamente custosos) e o cenário mundial de resistência aos antimicrobianos, os testes imunocromatográficos ganham destaque como métodos rápidos, simples e baratos para detecção direta dessa carbapenemase de grande importância clínica.

1.10. Imunocromatografia de fluxo lateral

Nos últimos anos, os ensaios imunocromatográficos têm ganhado bastante destaque para detecção dos mais diversos antígenos, como metais pesados, hormônios, toxinas, patógenos, pesticidas, drogas farmacêuticas (Posthuma-Trumpie et al. 2009), anticorpos (Nielsen et al. 2008) e produtos de amplificação de genes (Kamphee et al. 2015). Os testes de imunocromatografia têm sido utilizados com sucesso na detecção de diferentes patógenos de importância clínica como, por exemplo, o TR DPP® Sífilis que detecta anticorpos contra a proteína recombinante GST p17 de *Treponema pallidum* (Ribeiro PPF s.d.), *Keypath* MRSA-MSSA que detecta a presença de *S. aureus* oxacilina-meticilina resistente diretamente da garrafa de hemocultura (Sullivan et al. 2013) e o TB Ag MPT64 que detecta a presença da proteína MPT 64 presente na superfície do *Mycobacterium tuberculosis* (Martin et al. 2011). Além disso, essa técnica também foi utilizada para detecção da expressão da metalo-β-lactamase do tipo IMP em *P. aeruginosa* (Kitao et al. 2011).

O aumento de estudos para o desenvolvimento desse tipo de método diagnóstico pode ser justificada pelo alto número de vantagens, como: baixo custo, rapidez na divulgação do

resultado, alta sensibilidade, ausência da necessidade de pessoal com alta qualificação para operação do teste e interpretação dos resultados, sendo possível a visualização do resultado a olho nu, simplicidade, requerimento de baixo volume de amostra, estabilidade em temperatura ambiente, longa durabilidade em estoque entre outras. Essas características tornam o teste imunocromatográfico uma alternativa bastante interessante, especialmente em países em desenvolvimento em que o emprego de outras técnicas é mais complicado. Adicionalmente, é uma plataforma amplamente aceita pelas pessoas e por agências regulatórias. O acoplamento da técnica de detecção de antígenos com biomoléculas marcadas, garantindo alta especificidade, com a técnica de cromatografia, dificultando interferências, gera um dispositivo diagnóstico de alto poder discriminatório e com características únicas (Posthuma-Trumpie et al. 2009; Ngom, 2010; Sajid et al. 2015; Koczula & Gallotta, 2016).

Existem algumas desvantagens acerca do ensaio imunocromatográfico, como qualquer outro método analítico, como o fato de ser uma técnica qualitativa ou semi-quantitativa na maioria dos casos, ter reprodutibilidade variável entre os lotes e, em alguns casos, haver necessidade de pré-tratamento da amostra a ser avaliada (Posthuma-Trumpie et al. 2009; Bangs Laboratories, 2013; Sajid et al. 2015).

O teste imunocromatográfico é composto por quatro membranas (membrana de amostra, conjugado, nitrocelulose e absorvente) dispostas em um cartão plástico de suporte. O funcionamento do teste consiste na migração por capilaridade do analito líquido através de uma membrana polimérica, com a formação de um conjugado após passagem por uma região contendo biomoléculas marcadas, ligação com elementos imobilizados na linha de detecção e, por fim, a chegada na membrana absorvente. A fita, contendo reagentes secos que são ativados após aplicação da amostra líquida, é composta por uma membrana porosa e membranas absorventes acessórias, contendo os elementos de reação, ajustadas em um invólucro plástico apropriado com uma janela para se acrescentar a amostra de teste e outra para leitura do resultado da reação. A membrana da amostra é o local de aplicação do analito, sendo responsável pelo transporte do analito de forma homogênea e contínua para outros componentes do dispositivo, também é região em que uma solução tampão é aplicada para auxiliar a migração do conjugado. A membrana do conjugado compreende o local onde biomoléculas marcadas estão localizadas e deve ser capaz de liberar o conjugado após contato com a amostra líquida. A membrana polimérica (sendo mais comum à de nitrocelulose) é o sítio onde estão localizadas as linhas de teste e controle e deve permitir uma ligação forte e suporte para a captura dos elementos em migração. A linha de teste será a região de detecção do analito, onde estará imobilizado o elemento de captura. A linha controle funciona como garantia de que houve um

fluxo do líquido pela membrana. A membrana absorvente tem como função manter o fluxo do líquido pela membrana absorvendo-o e impedindo seu retorno (Figura 1.6) (Posthuma-Trumpie et al. 2009; Ngom, 2010; O’Farrell, 2013; Sajid et al. 2015; Koczula & Gallotta, 2016).

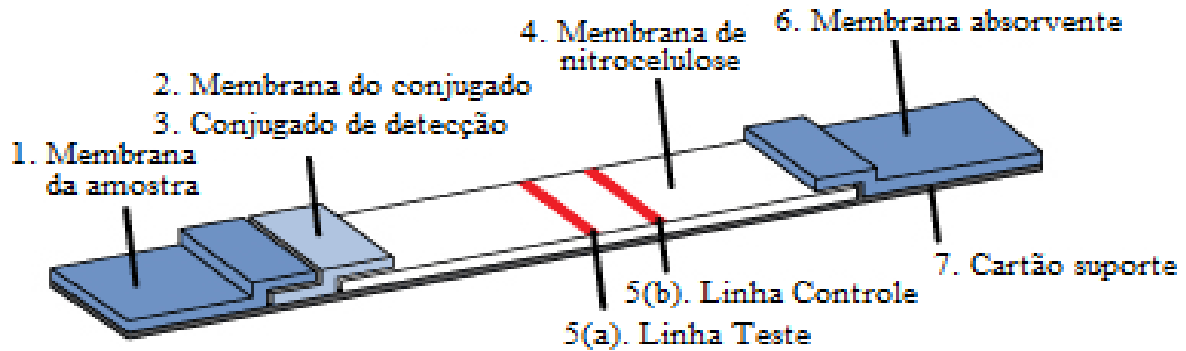


Figura 1.6: Componentes de um teste rápido imunocromatográfico. (1) membrana da amostra, (2) membrana do conjugado, (3) conjugado de detecção, (4) membrana de nitrocelulose, (5a) linha teste, (5b) linha controle, (6) membrana absorvente, (7) cartão plástico de suporte. Fonte: http://sites.path.org/dx/files/2013/05/LateralFlow_platform_labels4.gif.

O princípio do teste imunocromatográfico consiste na detecção da molécula alvo por uma biomolécula específica. A reação antígeno-anticorpo é o sistema de detecção mais utilizado em vários ensaios de imunodiagnóstico (ELISA, *Western Blot*), apesar de existirem outras estratégias como o sistema avidina-biotina e hibridização por ácidos nucleicos (O’Farrell, 2013; Koczula & Gallotta, 2016). Diferentes abordagens podem ser empregadas nos testes imunocromatográficos com o sistema antígeno-anticorpo visando a detecção da molécula alvo, como o ensaio competitivo e o direto. O ensaio competitivo é empregado para detecção de antígenos de baixo peso molecular cujo determinante antigênico único não pode ser ligado por dois anticorpos ao mesmo tempo. Neste tipo de teste, o resultado é positivo quando somente a linha correspondente ao controle é visualizada, visto que ocorre uma saturação do anticorpo conjugado a um marcador, pelo antígeno aplicado no teste, impedindo que o primeiro se ligue ao antígeno imobilizado na linha de captura (Bangs Laboratories, 2013; Sajid et al. 2015; Koczula & Gallotta, 2016). O ensaio direto é o mais empregado em testes imunocromatográficos, sendo comumente utilizado para antígenos maiores com maior número de epítomos. O formato direto pode ser: (i) do tipo sanduíche, que consiste na ligação do antígeno a um anticorpo conjugado antígeno-específico na membrana do conjugado, seguida pela migração do conjugado até a zona de detecção para ser ligado a outro anticorpo, também específico para o antígeno, imobilizado na linha de captura (Butler et al. 2001); ou (ii) do tipo que detecta anticorpos, ou seja, o material a ser analisado é um soro ou sangue que se liga a um anticorpo

conjugado específico para o anticorpo alvo e que, após a migração, se liga ao antígeno impregnado na membrana (Nielsen et al. 2008).

1.10.1. Anticorpos e Marcadores

Os anticorpos são moléculas de grande importância nos testes imunocromatográficos de fluxo lateral haja vista que a eficácia do método está diretamente relacionada com a sua qualidade em relação à especificidade e afinidade. A especificidade é a capacidade de um anticorpo de reconhecer e distinguir o seu antígeno alvo frente a outras moléculas. Afinidade é a força de ligação de um anticorpo ao seu antígeno (Murphy et al. 2008).

Os anticorpos podem ser classificados como policlonal ou monoclonal. Os anticorpos policlonais podem ser obtidos por uma resposta natural do sistema imunológico ou pela imunização, sendo o resultado desses eventos uma mistura de anticorpos com diferentes especificidades e afinidades. A heterogeneidade e baixa especificidade são os pontos negativos dos anticorpos policlonais quando empregados em testes diagnósticos, assim como a reprodutibilidade, haja vista a variabilidade nas suas características quando produzidos em diferentes animais ou bateladas. No entanto, o soro policlonal tem a capacidade de reconhecer diferentes epítomos do antígeno, sendo uma característica bastante vantajosa para a sensibilidade de imunoensaios. Além disso, a rapidez de produção de grandes volumes de anticorpo, o custo relativamente baixo e a possibilidade de maior afinidade são outros pontos a serem considerados na escolha do melhor tipo de anticorpo para o objetivo do estudo (Murphy et al. 2008; O'Farrel, 2013).

Por sua vez, os anticorpos monoclonais são moléculas obtidas por culturas de células híbridas produtoras de anticorpos ou por engenharia genética. A grande vantagem desse tipo de anticorpo é a sua obtenção de forma ilimitada e também pela sua alta especificidade a um único epítomo. Adicionalmente, a homogeneidade dos anticorpos monoclonais é outra característica importante que os tornam ferramentas úteis para aplicação em imunoensaios, visto que refletem na alta reprodutibilidade dos resultados. Todavia, a produção desses anticorpos requer frequentemente uma tecnologia de maior custo e também exige maior tempo de obtenção (Murphy et al. 2008; O'Farrel, 2013).

Diversos tipos de marcadores para geração de sinal podem ser utilizados para conjugação com biomoléculas, como ouro coloidal, microesferas de látex, partículas magnéticas, enzimas e fluoróforos. Um marcador ideal deve ter como características principais a manutenção de suas propriedades após conjugação com a biomolécula, a capacidade de ser

detectado em baixas concentrações, estabilidade, facilidade para conjugação e para escalonamento, ausência ou baixa taxa de interações não-específicas e baixo custo. O ouro coloidal é o marcador mais utilizado em testes imunocromatográficos (Karakus & Salih, 2013) devido a sua alta afinidade e estabilidade (Sajid et al. 2015), além do baixo custo para seu preparo, disponibilidade no comércio e facilidade de visualização devido à cor forte (Koczula & Gallotta, 2016).

1.11. Justificativa

Segundo a OMS, o uso abusivo dos antibióticos deveria ser reduzido com investimentos em pesquisa que melhorassem a acurácia e a rapidez na identificação de patógenos multirresistentes e dos genes de resistência, além de programas na prevenção e no uso racional das drogas ainda disponíveis para a prática médica (OMS, 2001).

Com o aumento alarmante do número de relatos de bactérias produtoras de NDM em diferentes regiões geográficas e a expansão da disseminação desse gene de resistência para diversos micro-organismos, a detecção de NDM se torna fundamental para o controle de IRAS, com o objetivo de prevenir a disseminação desse tipo de resistência e para a orientação da terapia antimicrobiana. A inexistência de terapia antimicrobiana adequada, a ausência de inibidor de metalo- β -lactamase efetivo clinicamente e as poucas perspectivas de novos antimicrobianos ressaltam ainda mais a importância da detecção de NDM (Johnson & Woodford, 2013; Dortet et al. 2014a; Pagano et al. 2015; Rafei et al. 2014).

A imunocromatografia é uma alternativa aos métodos tradicionais de diagnóstico bacteriano, pois concentra a reação antígeno-anticorpo em uma única fase sólida, sendo esta mantida e utilizada em temperatura ambiente, o que proporciona melhor praticidade no seu uso. Além disso, os testes imunocromatográficos apresentam alta sensibilidade e especificidade semelhantes aos testes de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) de terceira geração e com o custo mais baixo. (Rajerison et al. 2009), sendo uma alternativa que se destaca para uso em laboratórios de países em desenvolvimento que não dispõem de recursos para uso de técnicas mais onerosas.

Portanto, o desenvolvimento de um teste rápido imunocromatográfico para a detecção de bactérias produtoras de NDM se justifica por ir ao encontro dos interesses públicos e recomendações da OMS, permitindo a tomada de decisões rápidas e mais direcionadas pelo corpo clínico, frente a casos de infecções associadas a esses patógenos.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo

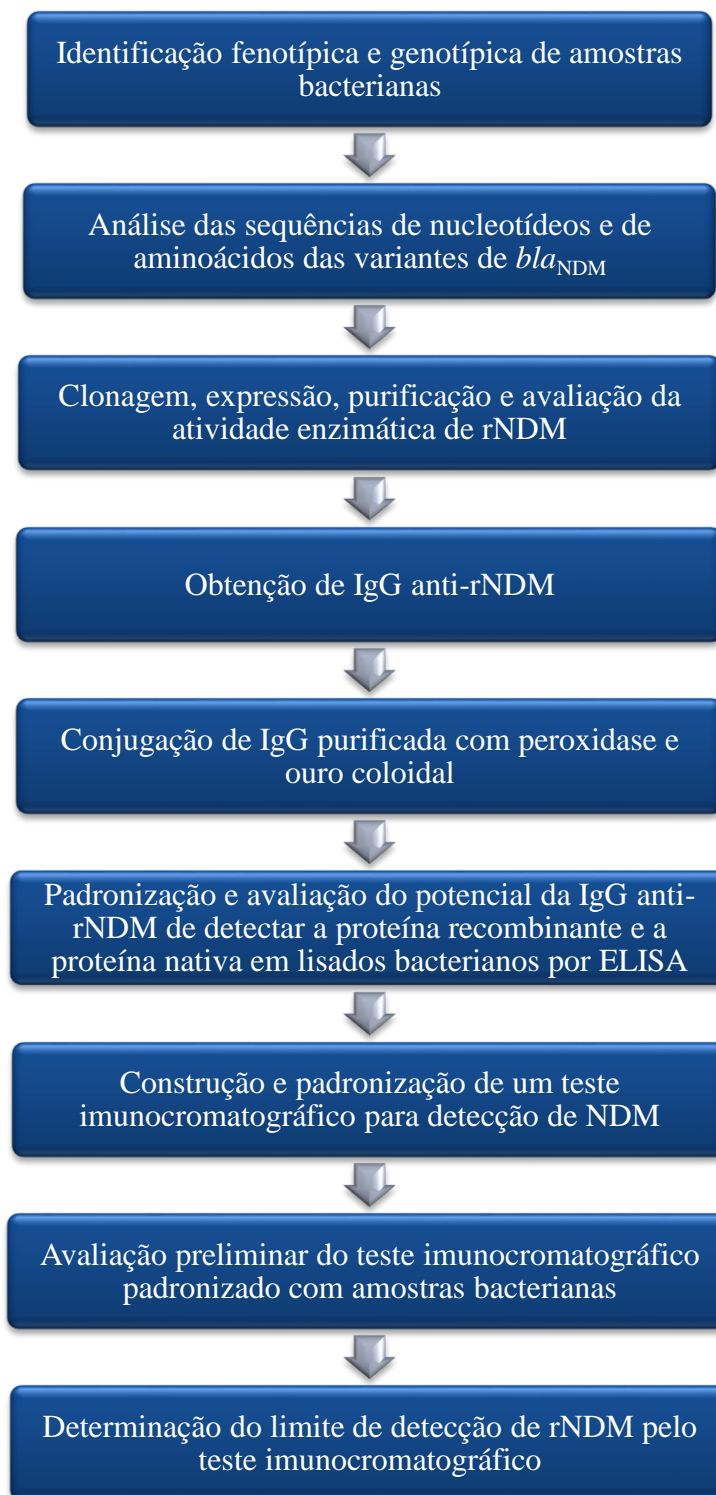
Clonagem, expressão, purificação e avaliação enzimática da metalo- β -lactamase do tipo NDM visando a padronização de um teste imunocromatográfico para a detecção de bactérias produtoras de NDM.

2.2. Objetivos específicos

- a.** Clonar, expressar, purificar e avaliar a atividade enzimática da proteína recombinante NDM.
- b.** Produzir soro policlonal anti-rNDM em coelho.
- c.** Conjugar as IgGs anti-NDM com partículas de ouro coloidal.
- d.** Padronizar o complexo IgG anti-NDM-ouro coloidal para utilização na plataforma imunocromatográfica de fluxo lateral.
- e.** Testar o conjugado na plataforma imunocromatográfica de fluxo lateral, utilizando a proteína recombinante e diferentes amostras bacterianas produtoras e não produtoras de NDM.

III. METODOLOGIA

3.1. Fluxograma



3.2. Amostras bacterianas

Bactérias produtoras de enzimas do tipo NDM, VIM, IMP, KPC, SPM e OXA de diferentes espécies depositadas na Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH/Fiocruz) foram utilizadas nos ensaios deste estudo. O LAPIH recebe rotineiramente amostras bacterianas dos LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública) de diferentes estados, previamente isoladas de espécimes clínicos, e realiza testes fenotípicos e genotípicos para identificação de genes de resistência associados aos carbapenêmicos.

Tabela 3.1: Características das amostras bacterianas utilizadas neste estudo.

CCBH	Espécie	Carbapenemase
18797 ¹	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM
17696	<i>Klebsiella oxytoca</i>	NDM
17812	<i>Morganella morgannii</i>	NDM
18798	<i>Escherichia coli</i>	NDM
18800	<i>Providencia stuartii</i>	NDM
17855	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM
15948	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM
15865	<i>Acinetobacter berezeniae</i>	NDM
18717	<i>Citrobacter freundii</i>	NDM
19720	<i>Providencia rettgeri</i>	NDM
17959	<i>Acinetobacter baumannii</i>	NDM
23483	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SPM
24061	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM
24208	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP
24269	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
24267	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51-27
20007	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM
6527	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
8107	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
8311	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-24
19418	<i>Enterobacter cloacae</i>	OXA-48
-	<i>Escherichia coli</i> TOP10*	-
-	<i>Escherichia coli</i> BL-21 STAR™ (DE3)* ²	-

*Amostras comerciais.

¹ Controle positivo.

² Controle negativo.

3.2.1. Identificação das amostras bacterianas da CCBH

As amostras bacterianas obtidas na CCBH foram submetidas a testes fenotípicos e genotípicos visando confirmar sua identificação e constatar a pureza das culturas. Para tal, 25 µL de cultra de bactérias estocadas a - 20 °C foram inoculados em 10 mL de TSB (caldo soja tripticaseína) acrescido de meropenem a 1 µg/mL e 15 µL foram semeados em ágar CLED (*cystine lactose electrolyte deficient*) pela técnica de esgotamento para obtenção de colônias isoladas e para verificação de possíveis contaminações. Tanto a cultura em caldo TSB quanto em ágar CLED foram incubadas a 37 °C por 16h.

A partir de uma colônia isolada em ágar CLED, testes bioquímicos foram realizados para identificação e confirmação bacteriana dos isolados. As provas bioquímicas empregadas para detecção de enterobactérias e bacilos Gram-negativos não-fermentadores visam à avaliação da: fermentação de glicose, sacarose e lactose, produção de CO₂, produção de H₂S (sulfeto de hidrogênio) em meio TSI (ágar tríplice açúcar e ferro); utilização de citrato em ágar citrato Simmons; produção de descarboxilases (lisina, ornitina e arginina) em caldo base Moeller para descarboxilase; teste de indol, produção de H₂S e motilidade em meio SIM (ágar sulfato/indol/motilidade); e produção de urease em ágar base uréia. Após o inóculo da amostra bacteriana, os tubos com os testes bioquímicos foram incubados a 37 °C por 24h.

A partir da cultura dos isolados em caldo, 8 mL foram utilizados para estoque em BHI acrescido de glicerol 20% a - 80 °C. Para tal, uma centrifugação da cultura foi realizada a 6.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 800 µL de BHI (proporção de 100 µL a cada 1 mL de cultura). Após uma homogeneização, 800 µL de BHI acrescido de glicerol 40% foram adicionados e 200 µL da mistura foram distribuídos em criotubos para armazenamento.

3.2.2. Avaliação da presença do gene *bla_{NDM}* nas amostras bacterianas

Dois mililitros das culturas de amostras bacterianas produtoras de NDM foram usados para extração do DNA genômico de acordo com as especificações descritas no kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen). Em seguida, uma PCR foi realizada para confirmar a presença do gene *bla_{NDM}*. A PCR foi realizada através do uso dos mesmos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na clonagem, o oligonucleotídeo iniciador senso 5' CTAT **GCTAGC** TCA GCG CAG CTT GTC GGC CAT 3' (20 µM) e o oligonucleotídeo iniciador anti-senso 5' CTAT **AAGCTT** GGT GAA ATC CGC CCG ACG 3' (20 µM). Também serão adicionados na reação 12,5 µL de *GoTaq[®] Green Master Mix 2x* (Promega) e água em q.s.p. resultar em uma reação de 25 µL.

O produto amplificado pela reação de PCR, assim como o marcador de peso molecular 1kb *Plus Ladder* (Invitrogen), foram submetidos à eletroforese a 100 V em gel de agarose (Invitrogen) a 1% e em tampão TAE 1x (Tampão Tris-Acetato-EDTA).

Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução de *Gel Red* (Invitrogen) a 0.3 µL/mL por 30 minutos e a banda referente ao gene *bla_{NDM}* sem a sequência codificante do peptídeo sinal (~723 pb) foi visualizada sob luz ultravioleta no transiluminador e fotodocumentador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia).

3.3. Análise das sequências de nucleotídeos e de aminoácidos das variantes de *bla_{NDM}*

Um alinhamento de sequências nucleotídicas de doze variantes de *bla_{NDM}* (NDM-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -13, -14) foi realizado através do programa *Geneious* 8 (Kearse et al. 2012) visando a determinação do grau de similaridade entre as variantes e a seleção de regiões conservadas para desenhar os oligonucleotídeos iniciadores para clonagem.

3.4. Clonagem, expressão, purificação e avaliação da atividade enzimática de rNDM

O sistema Novagen pET-28a-c (+) (Merck Millipore) foi utilizado para clonagem e expressão do gene *bla_{NDM}* em *E. coli*. O sistema pET28a utiliza uma abordagem de clonagem clássica caracterizado pelo uso de enzimas de restrição para inserção do gene de interesse no vetor.

3.4.1. Amplificação do gene *bla_{NDM}*

O DNA genômico de *K. pneumoniae* CCBH 18797 produtora de NDM-1 foi extraído de acordo com as especificações descritas no kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen). Em seguida, o gene *bla_{NDM}* foi amplificado (sem a sequência referente ao peptídeo sinal) através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em termociclador Veriti de 96 poços (Applied Biosystems, EUA). A PCR foi realizada através do uso de oligonucleotídeo iniciador senso 5' CTAT **GCTAGC** TCA GCG CAG CTT GTC GGC CAT 3' (20 µM), o qual contém um sítio de restrição para a enzima *NheI* (Promega) na extremidade 5', e o oligonucleotídeo iniciador anti-senso 5' CTAT **AAGCTT** GGT GAA ATC CGC CCG ACG 3' (20 µM), com o sítio de restrição para a enzima *HindIII* (Promega) no terminal 3'. Também foram adicionados na reação 2 µL do DNA genômico extraído (60 ng), 25 µL de *GoTaq[®] Green Master Mix 2x* (Promega) e água em q.s.p. resultar em uma reação de 50 µL. O produto amplificado pela reação de PCR, assim como o marcador de peso molecular 1 kb *Plus Ladder* (Invitrogen), foram submetidos à eletroforese a 100 V em gel de agarose (Invitrogen) a 1% (m/v) e em tampão TAE

1x (Tris 242 g/L + ácido acético glacial 57.1 mL/L + EDTA 100 mL/L).

Após a eletroforese, o gel foi corado em uma solução de *Gel Red* (Invitrogen) a 0.3 µL/mL por 30 min e a banda referente ao gene *bla_{NDM}*, sem a sequência que codifica o peptídeo sinal, (~723pb) foi visualizada sob luz ultravioleta no transiluminador e foto documentador L-PIX EX (Loccus Biotecnologia). O restante do produto da PCR foi purificado com o *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e quantificado através de espectrofotômetro do tipo NanoDrop® 1000 (ThermoScientific™).

3.4.2. Obtenção de clones recombinantes de *E. coli* TOP10 com a construção pET28a+*bla_{NDM}*

Tanto o gene *bla_{NDM}* amplificado e purificado (5 µg) quanto o vetor pET28a (6 µg) purificado foram digeridos com as enzimas de restrição *NheI* CQ 10 u/µL (Promega) e *HindIII* 10 u/µL (Promega), em uma reação com Tampão B 1X, BSA 10 µg/µL e água q.s.p 50 µL, a 37 °C por 4h, para geração de terminais coesivos, e posteriormente purificados pelo *SV Wizard PCR and Gel Clean Up System* (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

Uma desfosforilação do vetor pET28a foi realizada visando evitar a recircularização do vetor após sua digestão com as enzimas de restrição. Para tal, o vetor foi submetido a uma reação contendo a enzima SAP 1 u/µL (Promega), tampão 1X de SAP (Promega) e água em q.s.p. resultar em uma reação de 30 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 15 min.

Após a desfosforilação do vetor, a ligação do inserto ao vetor pET28a foi realizada com a enzima T4 DNA ligase 1 u/µL (Invitrogen) em uma reação com relação vetor/inserto de 1:10, tampão 5X da ligase (Invitrogen) e água em q.s.p. 20 µL em termociclador Veriti de 96 poços (Applied Biosystems, EUA) a 14 °C por 16h.

Para a obtenção de clones recombinantes, a construção pET28a+*bla_{NDM}* foi inserida em células eletrocompetentes de *E. coli* TOP10 através de transformação por eletroporação com o uso de um eletroporador Micro-Puber (Bio-Rad). A transformação foi realizada pela adição de 2 µL da construção a 100 µL de células, seguida pela eletroporação, incubação em caldo Luria-Bertani (LB) a 37 °C por 1h em agitação a 200 rpm e, por fim, semeadura de 10%, 40% e 50% do crescimento em ágar LB acrescido de canamicina a 50 µg/mL e incubação a 37 °C por 16h. Somente aquelas células que receberam a ligação foram capazes de crescer no meio de cultura visto que o vetor apresenta marcador de resistência ao antimicrobiano.

Diferentes colônias de possíveis clones recombinantes de *E. coli* TOP10 foram selecionadas para experimentos posteriores. Uma PCR foi realizada para confirmação da presença do gene *bla_{NDM}* direto da colônia (*Colony PCR*) e, após, a mesma colônia foi inoculada em 5 mL de caldo infusão de cérebro e coração (BHI) acrescido de canamicina a 50 µg/mL e incubada a 37 °C por 16h em agitação a 200 rpm. A partir da cultura de clones recombinantes, uma extração do DNA plasmidial foi realizada com o uso de *High Pure Plamid Purification Kit* (Roche), segundo as especificações do fabricante, e uma quantificação foi realizada através de fluorímetro Qubit (Invitrogen). Os plasmídeos purificados foram testados quanto à presença do inserto no vetor através de uma nova digestão com as mesmas enzimas de restrição seguida de uma eletroforese. A presença do inserto também foi avaliada por PCR para detecção do gene *bla_{NDM}* a partir do plasmídeo purificado. As cepas bacterianas contendo a construção pET28a+*bla_{NDM}* foram mantidas a -80 °C em meio BHI acrescido de glicerol a 20%.

3.4.3. Sequenciamento das construções pET28a+*bla_{NDM}*

Após extração do DNA plasmidial dos clones recombinantes, foi realizado o sequenciamento através de um analisador de DNA 3730xl de 96 capilares (Applied Biosystems, EUA) na Plataforma de Sequenciamento de DNA (Fiocruz), de acordo com o método de Otto et al (2008), para confirmação da presença do gene *bla_{NDM}* e, também, para verificar se houve alguma mutação na sequência de nucleotídeos durante o processo.

A reação de sequenciamento foi composta por 2 µL de Big Dye, 2 µL de Tampão Big Dye, 1 µL de oligonucleotídeos iniciadores a 3.2 µM, 5µL DNA plasmidial (~100 ng) e água em q.s.p. 10 µL por poço de uma microplaca. O programa da reação se constituiu de um ciclo de desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10s, anelamento a 50 °C por 5s e extensão a 60 °C por 4 min. Seis oligonucleotídeos iniciadores diferentes foram empregados na reação de sequenciamento: (i) senso 5´ CGAAGCTGAGCACCGCATTA 3´ e anti-senso 5´ CAGCGCAGCTTGTCGGC 3´ utilizados na clonagem que amplificam toda a extensão do gene *bla_{NDM}*; (ii) senso 5´ GGAGATCAACCTGCCGGTC 3´ e anti-senso 5´ ATCTTGTCCTGATGCGCGTG 3´ que se anelam na parte interna do gene de interesse; e (iii) senso 5´ TAATACGACTCACTATAGGG 3´ e anti-senso 5´ GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3´ que se anelam nas regiões do vetor pET28a que flanqueiam o inserto.

Ao término da amplificação, foi realizada uma precipitação dos produtos alvos amplificados seguindo o protocolo a seguir: adição de 2.5 µL de EDTA 125 mM; breve centrifugação para que o EDTA alcance o fundo do poço; adição de 25 µL de etanol P.A e homogeneização; incubação por 15 min em temperatura ambiente; centrifugação a 3.000 xg por

30 min a 4 °C; inversão da placa com movimento único visando desprezar o líquido; centrifugação a 120 xg por 60s com placa invertida sobre duas folhas de *Lab Wipe*; repetição da etapa anterior com folhas novas de *Lab Wipe*; incubação da placa aberta, coberta com folha de papel alumínio, a 65 °C por 5 min. Após a última etapa, as placas podem ser estocadas a – 20 °C até a eletroforese capilar.

3.4.4. Obtenção de clones de *E. coli* BL-21 STAR™ (DE3) contendo a construção pET28a+*bla*_{NDM}

Células de *E. coli* BL-21 Star™ (DE3), foram transformadas por eletroporação com a construção pET28a+*bla*_{NDM}. A transformação foi realizada pela adição de 1 µL da construção em 100 µL de células, seguida pela eletroporação, incubação em caldo LB a 37 °C por 1h em agitação a 200 rpm e, por fim, semeadura de 10%, 40% e 50% da cultura em ágar LB acrescido de canamicina a 50 µg/mL e glicose 1%, seguido de incubação a 37 °C por 16h.

3.4.5. Indução da expressão de rNDM

As próximas etapas consistiram na geração de biomassa de clones recombinantes de *E. coli* BL-21 STAR™ (DE3) para experimentos posteriores e estoque. Primeiramente, uma colônia (previamente confirmada por PCR acerca da presença do inserto de interesse) foi colhida e transferida para 10 mL de caldo TB, contendo canamicina a 50 µg/mL e glicose 1%, para gerar o pré-inóculo. O pré-inóculo foi cultivado a 37 °C por 16 horas, com agitação de 200 rpm. Após esse período, 4 mL do pré-inóculo (diluição 1:50) foram inoculados em 200 mL de caldo TB, contendo canamicina a 50 µg/mL e glicose 1%. As células foram cultivadas a 37 °C, com agitação de 200 rpm, até atingir a densidade ótica (D.O.) de 0.6-0.8, no comprimento de onda de 600 nm. Após a incubação, 8 mL da cultura foram utilizados para estoque em BHI acrescido de glicerol 20% a -80 °C e, paralelamente, três alíquotas de 1 mL de cultura foram coletadas, centrifugadas a 14.000 rpm por 2 min e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados foram congelados a -20 °C para servir como controle negativo em etapas posteriores.

Para expressar a rNDM, o restante da cultura foi induzido com isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 1 mM na temperatura de 28 e 37 °C por 4 horas, com agitação de 200 rpm. Após esse período, foi realizada a leitura da D.O._{600nm} da cultura, conforme descrito anteriormente. Alíquotas de 1 mL e 30 mL foram centrifugadas a 14.000 rpm por 2 min e por 4.500 rpm por 15 min, respectivamente, e, após, os sobrenadantes descartados. Os precipitados foram estocados a -20 °C para posterior análise.

3.4.6. Análise da expressão e da solubilidade por SDS-PAGE

Os precipitados de células induzidas e não induzidas com IPTG foram ressuspensos em tampão A (Tris 20 mM + EDTA 1 mM) e em tampão B (Tris 20 mM + EDTA 1 mM + Triton 0.5%), de acordo com a proporção de 25 μ L de tampão para cada 0.1 de D.O._{600nm}. Ambas as amostras ressuspensas foram submetidas a três ciclos de sonicação (amplitude de 30% por 10 segundos) em gelo, com intervalo de 30s entre os ciclos. Em seguida, 10 μ L do material sonicado foi separado e acrescido de 2 μ L de tampão de amostra 4x (Tris 20 mM + EDTA 1 mM + PMSF 1 mM pH 8.0) como fração total para posterior aplicação no gel de SDS-PAGE. O restante do total sonicado foi submetido à centrifugação a 14.000 rpm por 10 min. O sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e 10 μ L foram acrescidos de 2 μ L de tampão de amostra 4x. O precipitado (fração insolúvel) foi ressuspenso em tampão de amostra 1x, utilizando o mesmo volume empregado inicialmente para lisar as células. Por fim, todas as frações com tampão de amostra foram submetidas à fervura por 3-5 min e 12 μ L do extrato total, da fração solúvel e da fração insolúvel foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% a 120 V em condições desnaturantes (SDS-PAGE), com uso de *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad) como padrão de peso molecular. Uma solução corante composta de *Coomassie brilliant blue R-250* 0.2% em uma mistura de metanol 30%, ácido acético 10%, água 60% (v/v/v) foi utilizada para revelação das bandas no gel. A solução descorante empregada foi a mesma usada anteriormente na etapa de revelação, exceto pela ausência de *Coomassie brilliant blue R-250* 0.2% (m/v), sendo essa solução renovada até completa visualização das bandas (Neuhoff et al. 1985).

3.4.7. Purificação da rNDM por IMAC (cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados)

O precipitado proveniente da centrifugação de 30 mL de células induzidas foi ressuspenso em tampão Tris 20 mM, de acordo com a proporção de 25 μ L de tampão para cada 0.1 de D.O._{600nm}, seguido por uma centrifugação a 6000 rpm por 10 min e filtração do sobrenadante em membrana de 0.22 μ m para remoção de impurezas. A purificação da proteína recombinante a partir da fração solúvel foi realizada em uma coluna *HisTrap™ HP* (1 mL) contendo resina de íons níquel no cromatógrafo *ÄKTA pure* (GE Healthcare), através do programa *Unicorn*, com um gradiente linear de imidazol 1 M. A eluição da proteína recombinante foi realizada com o tampão Tris 20 mM acrescido de imidazol a 300-400 mM.

O imidazol presente na amostra purificada foi removido por cromatografia de gel filtração, através do uso de uma coluna *HiTrap™ Desalting* (5mL) no cromatógrafo *ÄKTA pure*

(GE Healthcare), visto que o composto pode interferir na etapa posterior de quantificação proteica. A proteína recombinante foi eluída em tampão (PBS 1x + NaH₂PO₄ 10 mM + NaCl 150 mM).

A quantificação da rNDM após a cromatografia de gel filtração foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA), utilizando o kit *Pierce*[®] *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) segundo as instruções do fabricante. Adicionalmente, a rNDM purificada após cromatografia de gel filtração foi analisada por SDS-PAGE em diferentes quantidades (5 µg, 10 µg, 20 µg e 30 µg) para avaliação da presença de contaminantes e para determinação do grau de homogeneidade por densitometria das bandas presentes através do *GS-800 Calibrated Densitometer* (BioRad).

Experimento de *Western blotting* foi realizado visando avaliar se a proteína expressa possui uma cauda de polihistidina, cuja sequência de nucleotídeos está presente em vetores pET28a. Para tal, aplicou-se amostras referentes às frações solúveis e insolúveis do precipitado não-induzido e induzido com IPTG, ao filtrado da coluna de cromatografia de gel filtração, a rNDM purificada a 2.5 µg e a 5 µg em dois géis idênticos de poliacrilamida a 12%. Um gel foi submetido à revelação descrita no item 3.4.6, enquanto que o outro foi utilizado para transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose de 0.22 µm (BioRad) através do sistema *Transblot SD – Semi dry transfer cell* (BioRad).

3.4.8. Avaliação biológica de rNDM

Visando detectar se a proteína recombinante NDM manteve sua capacidade hidrolítica, foram realizados os testes fenotípicos RAPIDEC CARBA NP (bioMeriéux), segundo as instruções do fabricante, e Blue Carba (Pires et al. 2013). Resumidamente, os procedimentos para realizar o teste Blue Carba consistiram na aplicação de 2 µL de rNDM pura (1,3 µg) e de alíquotas de diluições seriadas da proteína (razão 1:10) em (a) tubo A contendo com 100 µL solução Blue Carba (azul de bromotimol 0,04% + ZnSO₄ 0,1 mM + DMSO, pH 7.0), (b) tubo B com 100 µL solução Blue Carba + 0,6 mg imipenem e (c) tubo C com 100 µL solução Blue Carba + 0,6 mg imipenem + EDTA 0,1M, seguida por uma incubação a 37 °C por 20 min. O teste é interpretado como positivo para presença de carbapenemases pela alteração da cor azul escuro para uma coloração amarela e/ou verde amarelado da solução do tubo B. O tubo controle A deve se manter azul escuro, enquanto que o tubo C deve apresentar uma coloração amarela e/ou verde amarelado caso a enzima não seja uma metalo-β-lactamase.

3.5. Obtenção de IgG anti-rNDM

A primeira etapa consistiu na coleta de aproximadamente 5 mL de sangue total, a partir da artéria central da orelha, de dois coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) com seis semanas para obtenção do soro pré-imune. A obtenção do soro foi realizada por retração de coágulo, caracterizado pela centrifugação do sangue a 2.000 rpm por 30 min, incubação a 37 °C por 45 min, coleta do sobrenadante e estoque a -70 °C.

Seis dias após a coleta do soro pré-imune, três inoculações via intramuscular foram efetuadas, sendo cada uma de 200 µg de proteína recombinante adsorvida a 200 µg de hidróxido de alumínio em um volume de 1 mL, com intervalo de quatorze dias entre as doses. Treze dias após a terceira dose foi realizada a primeira coleta de sangue imune e, no dia seguinte, os coelhos foram inoculados com um reforço intravenoso de 500 µL com 200 µg da proteína recombinante pura. Sete dias após a administração do reforço, os coelhos foram submetidos à punção cardíaca para coleta de sangue total. A produção do soro policlonal em coelhos foi realizada seguindo as normas e aprovações dadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob número de licença LW-16/16 (ANEXO I), pelo Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN).

3.5.1. Determinação do título de anticorpos anti-rNDM no soro policlonal

O título de anticorpos anti-rNDM no soro policlonal foi avaliado por ELISA. Para tal, 200 ng da proteína NDM recombinante purificada foi adicionada por poço em uma microplaca para ELISA e diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6. A placa foi incubada a 4 °C por 16h para adsorção do antígeno. Três lavagens com PBS-T (solução tampão fosfato de sódio 10 mM, Tween 20 0.05% pH 7.2) foram efetuadas seguidas do bloqueio com 200 µL/poço de PBS-*milk* 5% (solução tampão fosfato de sódio 10 mM + NaCl 150 mM + leite desnatado 5%) a 37 °C por duas horas. Após incubação, a solução de bloqueio foi desprezada e três lavagens com PBS-T foram realizadas.

Diluições seriadas do soro policlonal (razão 1:2) foram realizadas em PBS 1x + BSA 0.3% e 100 µL de cada diluição foram aplicados por poço, em triplicata. O soro pré-imune foi utilizado como controle e foi diluído na razão de 1:50. A reação foi novamente incubada a 37 °C por 1 hora e, após três lavagens com PBS-T, anticorpo anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase foi diluído a 1:30000 em PBS 1x + BSA 0.3% e 100 µL foram adicionados por poço. Após incubação a 37 °C por 1 hora, três lavagens com PBS-T foram realizadas seguidas pela incubação da reação com 100 µL/poço do substrato da enzima *Single Component TMB*

Peroxidase EIA Substrate kit (BioRad) por 10-15 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 N e as densidades óticas (D.O.) foram determinadas a 450 nm em leitor de microplacas.

3.5.2. Precipitação de IgG com sulfato de amônio

A purificação das IgGs do soro policlonal de coelho anti-rNDM foi realizada a partir da metodologia clássica de precipitação com sulfato de amônio. A precipitação foi conduzida a 50% de saturação, ou seja, razão de 1:1 em termos de volume de soro de coelho e solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Após incubação a 37 °C por 1 hora, a solução foi centrifugada a 10.000 xg por 20 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em Tris-HCl 50 mM pH 8.0. Este processo foi repetido três vezes até a ressuspensão final em 3 mL de tampão.

3.5.3. Dessalinização por Gel Filtração

Com o objetivo de remover o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e trocar o tampão de solubilização da amostra de anticorpos, uma dessalinização por gel filtração foi realizada com colunas PD-10 (resina: sepharose G25). A coluna foi equilibrada com 50 mL tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) e 3 mL de amostra foram aplicados. Após coleta de frações (0.5 mL e 1.0 mL), uma leitura foi realizada em espectrofotômetro (absorbância a 280 nm) e as frações com valores mais elevados de anticorpos foram unidas em um *pool* (volume final de 3.5 mL) para processamento posterior.

3.5.4. Purificação de IgG por cromatografia de Troca Iônica

Uma cromatografia de troca iônica do tipo aniônica foi realizada visando a separação de IgG de albumina. O processo foi conduzido em uma coluna HiTrap Q FF (5 mL) em um AKTA Prime Plus, pelo programa *Prime View*, através de gradiente de Tris-HCl 50 mM + NaCl 1 M de acordo com um método semi-padronizado, com otimizações para a purificação da IgG. A eluição da IgG foi realizada com tampão Tris 50 mM acrescida de 20% de NaCl.

As frações eluídas foram submetidas a processamento com membrana Amicon 15 visando concentração das amostras, dessalinização e ajuste de tampão. A quantidade de proteína total presente no material eluído foi determinada pelo método do ácido bicinonínico (BCA), utilizando o kit *Pierce[®] BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) segundo as instruções do fabricante. O processo de purificação e o conteúdo das amostras foram avaliados por SDS-PAGE.

3.6. Conjugação de IgG purificada com peroxidase para ensaios de ELISA

Primeiramente uma oxidação da HRP com NaIO₄ foi realizada visando permitir sua conjugação com a IgG. O processo de conjugação ocorreu através de uma reação de redução e foi interrompida via adição de NaBH₄. Uma cromatografia de gel filtração foi conduzida em seguida para promover a troca de tampão para PBS 1x (pH 7.2). Utilizou-se um estabilizante HRP Stabil PLUS (1:1 em volume) cuja ação permite o condicionamento da IgG na temperatura de 4 °C.

3.7. Conjugação de IgG purificada com ouro coloidal

A conjugação da imunoglobulina purificada com ouro coloidal foi realizada segundo metodologia modificada de Hermanson (2008), utilizada na produção de testes imunocromatográficos de Bio-Manguinhos (conteúdo específico sigiloso), para preparo de suspensão de partículas de ouro e para o processo de conjugação.

3.8. Padronização e avaliação do potencial da IgG anti-rNDM de detectar a proteína recombinante e a proteína nativa em lisados bacterianos por ELISA

A determinação da melhor condição de ELISA para detecção de rNDM foi realizada a partir da avaliação de diferentes concentrações de IgG anti-rNDM conjugada a peroxidase (1/2.000, 1/4.000, 1/8.000 e 1/16.000), de IgG anti-rNDM aderida por poço na microplaca de ELISA (50, 100 e 200 ng) e de proteína recombinante (1.000, 500 e 100 ng) em 100 µL de diluente de amostra/conjugado (Bio-Manguinhos) em duplicata.

A adsorção do anticorpo na microplaca foi realizada pela adição de IgG anti-rNDM nos poços e diluição em tampão de sensibilização. Após incubação da placa a 37 °C por 1h, cinco lavagens foram executadas com tampão de lavagem (PBS 1x + Tween 20 0,05%).

Com a obtenção do melhor resultado da padronização para detecção de rNDM, o controle positivo *K. pneumoniae* CCBH 18797 e o controle negativo *E. coli* BL-21 STAR™ (DE3) foram avaliados em triplicata sob a mesma condição. Para tal, colônias crescidas em meio Mueller-Hinton após 16-24h de incubação a 37 °C foram inoculadas em tampão até que fosse obtida uma escala 1 de MacFarland. Diferentes tipos de tampões foram avaliados visando avaliar o melhor método para a lise da amostra bacteriana como: o *Suspension Medium* do teste colorimétrico RAPIDEC CARBA NP (bioMérieux) para detecção de carbapenemases e o diluente de amostra/conjugado (Bio-Manguinhos) acrescido de detergentes SDS e Triton X-100 nas concentrações de 1, 0,5 e 0,1%. A proteína recombinante NDM foi empregada como

controle na padronização do tampão de lise. A incubação com os antígenos foi realizada a 37 °C por 1h seguida de cinco lavagens com tampão de lavagem.

Terminado o período de incubação, 100 µL de IgG anti-rNDM conjugada a peroxidase na diluição padronizada foram adicionados por poço e a reação foi incubada a 37 °C por 1h seguida de cinco lavagens com tampão de lavagem. Após as lavagens, a reação foi incubada a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, com 100 µL/poço do substrato da enzima *TMB Plus 2* (BioRad) por 15-20 min. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 N e as densidades óticas foram determinadas a 450 nm em leitor de microplacas.

As amostras clínicas *K. oxytoca* CCBH17696, *M. morgannii* CCBH 17812, *E. coli* CCBH 18798, *P. stuartii* CCBH 18800, *C. freundii* CCBH 17855, *K. pneumoniae* CCBH 15948 e controle positivo produtores de NDM foram avaliadas pelo ELISA padronizado. Também foram avaliados: *P. aeruginosa* CCBH 23483 produtora de SPM; *P. aeruginosa* CCBH 20007 produtora de VIM; *K. pneumoniae* CCBH 6527 e CCBH 8107 produtoras de KPC; *A. baumannii* CCBH 24267 produtor de OXA-58; *A. baumannii* CCBH 8311 produtor de OXA-24; *E. cloacae* CCBH 19418 produtor de OXA-48; e o controle negativo. A rNDM também foi utilizada no teste como controle.

O limite de detecção foi determinado a partir de diluições seriadas do controle positivo *K. pneumoniae* CCBH 18797 na razão de 1:2. Determinação estatística de desvio padrão foi realizada para quantificação da variação dos dados de D.O. entre as replicatas.

3.9. Construção e padronização de um teste imunocromatográfico para detecção de NDM

Um teste imunocromatográfico no formato sanduíche foi selecionado visando o desenvolvimento de um método para a rápida detecção de NDM (Figura 3.1). Para a determinação da melhor construção do dispositivo capaz de detectar rNDM, diferentes membranas, concentrações de anticorpos de captura (impregnado na membrana de nitrocelulose) e de detecção (conjugado ao ouro coloidal), concentrações de antígeno, e tipos de tampões de migração foram empregados na padronização do teste. Em uma primeira avaliação, membranas de nitrocelulose *Whatman Immunopore* de porosidade de 3, 10 e 15 µm foram utilizadas. Fluxos de 0.04, 0.06 e 0.08 µL/mm foram empregados para impregnação de anticorpo purificado na linha teste da membrana de nitrocelulose, de forma que haveria testes com massa de IgG de aproximadamente 210, 310 e 420 ng, respectivamente. Três diferentes fluxos de impregnação de anticorpo conjugado a ouro coloidal em membrana de fibra de vidro

(0.20, 0.30 e 0.40 $\mu\text{L}/\text{mm}$) foram avaliados (Tabela 3.2). A linha controle foi estabelecida pela impregnação de proteína A na concentração de 0.125 mg/mL em fluxo de 0.04 $\mu\text{L}/\text{mm}$. A leitura do teste foi realizada após 15 min da aplicação da amostra.

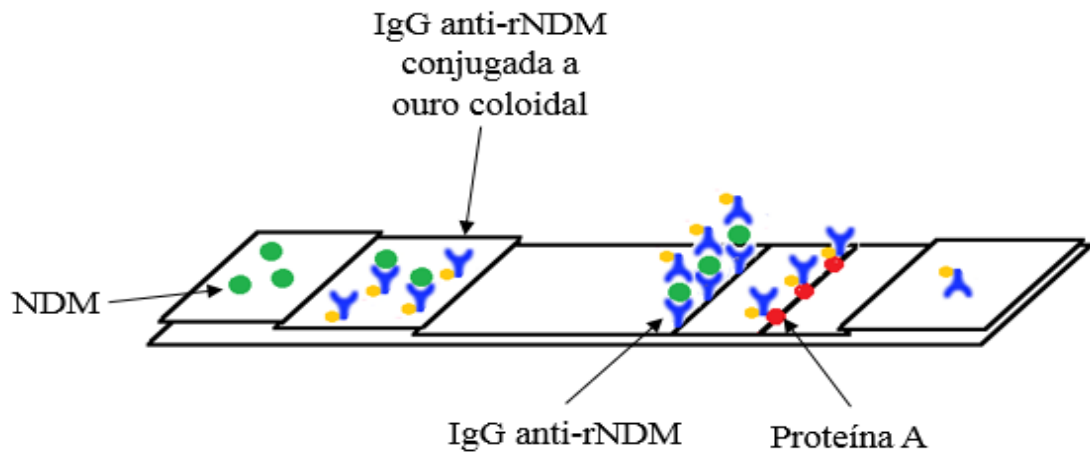


Figura 3.1: Teste imunocromatográfico no formato sanduíche para detecção de NDM. O analito contendo NDM (esfera verde) é aplicado na membrana da amostra, de onde migra para a membrana do conjugado, de forma a permitir a ligação da enzima aos anticorpos policlonais anti-rNDM conjugados a ouro coloidal (elemento azul na forma Y com esfera amarela). O complexo NDM-anticorpo policlonal conjugado migra por capilaridade na membrana de nitrocelulose até atingir a linha teste, onde será capturado por um anticorpo policlonal anti-rNDM (elemento azul em forma de Y) imobilizado. Os anticorpos conjugados não ligados ao antígeno serão capturados pela proteína A (esfera vermelha) imobilizada na linha controle. Todos os elementos que não foram capturados serão absorvidos pela membrana absorvente.

Estando estabelecidas as diferentes condições que seriam avaliadas, iniciou-se o processo de impregnação de anticorpo purificado e de proteína A em membrana de nitrocelulose, colada em um cartão suporte, através do equipamento BioDot XYZ 3050, seguido de uma incubação a 37 °C por 1h. O mesmo processo foi realizado para a impregnação de membrana de fibra de vidro com o anticorpo conjugado a ouro coloidal.

A montagem do teste imunocromatográfico foi finalizada com a colagem da membrana de fibra de vidro impregnada na parte superior do cartão suporte onde estava aderida a membrana de nitrocelulose. No espaço do cartão acima da membrana do conjugado, a membrana da amostra, composta por fibra de celulose, foi inserida. Na parte inferior do cartão e abaixo da membrana de nitrocelulose, a membrana de absorvente foi colada. Por fim, os cartões foram cortados em fitas de 5.2 mm através do equipamento *Programmable Star Matrix 2360* (Kinematic Automation) e as fitas foram acondicionadas em invólucros plásticos com janelas para aplicação de amostra e visualização do resultado do teste.

Tabela 3.2: Detalhamento dos 27 cruzamentos das diferentes condições e materiais avaliados visando a determinação da melhor condição para detecção de rNDM.

Nº do cruzamento	Porosidade de membrana de nitrocelulose (μc)	Fluxo de impreganação de anticorpo purificado na membrana de nitrocelulose ($\mu\text{L}/\text{mm}$)	Fluxo de impreganação de anticorpo conjugado a ouro coloidal em membrana de fibra de vidro ($\mu\text{L}/\text{mm}$)
1	3	0.04	0.20
2	3	0.04	0.30
3	3	0.04	0.40
4	3	0.06	0.20
5	3	0.06	0.30
6	3	0.06	0.40
7	3	0.08	0.20
8	3	0.08	0.30
9	3	0.08	0.40
10	10	0.04	0.20
11	10	0.04	0.30
12	10	0.04	0.40
13	10	0.06	0.20
14	10	0.06	0.30
15	10	0.06	0.40
16	10	0.08	0.20
17	10	0.08	0.30
18	10	0.08	0.40
19	15	0.04	0.20
20	15	0.04	0.30
21	15	0.04	0.40
22	15	0.06	0.20
23	15	0.06	0.30
24	15	0.06	0.40
25	15	0.08	0.20
26	15	0.08	0.30
27	15	0.08	0.40

Todos os cruzamentos foram testados frente à proteína recombinante NDM com o uso de tampão de migração e também frente a somente o tampão. Diversos tampões de migração (volume de 100 μL) foram testados na determinação do melhor cruzamento, como o tampão de migração para *immunoblot* (TMI) utilizado em Bio-Manguinhos adicionado de diferentes concentrações de uréia (0.150, 0.250, 0.500, 1 e 2M) e de detergentes como Triton X-100 e Tween 20. Também foi avaliado o tampão Tris 500 mM (pH 8,0) + caseína 0,4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM, utilizado em estudo desenvolvido por Oshiro e colaboradores (2015). Aqueles cruzamentos com o melhor resultado com rNDM foram então avaliados com os controles positivo e negativo.

A quantidade de massa bacteriana a ser utilizada no teste imunocromatográfico foi avaliada com o uso de alças bacteriológicas de 1, 5 e 10 μL e com agulhas bacteriológicas empregadas na coleta de uma quantidade de colônias crescidas em ágar Müeller-Hinton a 37 °C por 16-24h. O volume de tampão de migração utilizado na padronização do teste variou de 100 a 500 μL e o tempo de incubação da massa bacteriana no tampão foi de 0, 5, 10 e 15 min. Nessa primeira avaliação, o controle positivo *K. pneumoniae* CCBH 18797 e o controle negativo *E. coli* BL-21 Star™ (DE3) foram testados.

Em uma segunda padronização do teste com rNDM, tendo em vista o resultado da primeira, as membranas de nitrocelulose de porosidade de 3 e 8 μc foram avaliadas. Para impregnação de anticorpo purificado na linha teste da membrana de nitrocelulose, fluxos de 0.04, 0.06 e 0.08 $\mu\text{L}/\text{mm}$ foram usados, de forma haveria testes com massa de IgG de aproximadamente 624, 936 e 1.248 ng, respectivamente (Tabela 3.3). Os mesmos fluxos de impregnação de anticorpo conjugado a ouro coloidal em membrana de fibra de vidro foram empregados. A linha controle foi estabelecida pela impregnação de proteína A na concentração de 0.0625 mg/mL em fluxo de 0.08 $\mu\text{L}/\text{mm}$. A leitura do teste foi realizada após 15 min da aplicação da amostra.

Tabela 3.3: Detalhamento de 18 novos cruzamentos das diferentes condições e materiais avaliados visando a determinação da melhor condição para detecção de rNDM.

Nº do cruzamento	Porosidade de membrana de nitrocelulose (μc)	Fluxo de impregnação de anticorpo purificado na membrana de nitrocelulose ($\mu\text{L}/\text{mm}$)	Fluxo de impregnação de anticorpo conjugado a ouro coloidal em membrana de fibra de vidro ($\mu\text{L}/\text{mm}$)
1.1	3	0.04	0.20
2.1	3	0.04	0.30
3.1	3	0.04	0.40
4.1	3	0.06	0.20
5.1	3	0.06	0.30
6.1	3	0.06	0.40
7.1	3	0.08	0.20
8.1	3	0.08	0.30
9.1	3	0.08	0.40
10.1	8	0.04	0.20
11.1	8	0.04	0.30
12.1	8	0.04	0.40
13.1	8	0.06	0.20
14.1	8	0.06	0.30
15.1	8	0.06	0.40
16.1	8	0.08	0.20
17.1	8	0.08	0.30
18.1	8	0.08	0.40

Com a escolha dos cruzamentos com a melhor intensidade de linha para detecção de rNDM, o controle positivo e o controle negativo também foram utilizados para avaliação dos cruzamentos com lisados bacterianos. Diferentes quantidades de colônias foram testadas assim como volumes do tampão padronizado.

3.10. Avaliação preliminar do teste imunocromatográfico padronizado com amostras bacterianas

Com a padronização de um dispositivo imunocromatográfico com os controles positivo e negativo, o teste desenvolvido foi avaliado frente a amostras bacterianas produtoras de NDM e de outras carbapenemases. Para tal, colônias crescidas em ágar Müeller-Hinton a 37 °C por 16-24h foram inoculadas em tampão padronizado e a mistura foi aplicada na janela de amostra do teste imunocromatográfico. Bactérias produtoras de NDM das espécies *A. berezeniae* CCBH 15865, *C. freundii* CCBH 18717, *P. rettgeri* CCBH 19720, *A. baumannii* CCBH 17959 e o controle positivo foram avaliadas no dispositivo, assim como uma *P. aeruginosa* CCBH 23483 produtora de SPM, *P. aeruginosa* CCBH 24061 produtora de VIM, *P. aeruginosa* CCBH 24208 produtora de IMP, *K. pneumoniae* CCBH 24269 produtora de KPC, *A. baumannii* CCBH 24267 produtor de OXA-51-24 e o controle negativo. A leitura do teste foi realizada após 15 min da aplicação da amostra.

3.11. Determinação do limite de detecção de rNDM pelo teste imunocromatográfico

Visando determinar a quantidade mínima de rNDM que o teste imunocromatográfico seria capaz de detectar, uma diluição seriada da proteína recombinante a 472 µg/mL foi realizada em PBS 1x na razão de um 1:2 até a diluição de 1:16.384. Uma alíquota de 5 µL de cada diluição acrescida de 100 µL do tampão padronizado foi aplicada no dispositivo.

IV. RESULTADOS & DISCUSSÃO

4.1. Análise das sequências de nucleotídeos das variantes de *bla*_{N_{DM}}

O alinhamento de sequências nucleotídicas de doze variantes de *bla*_{N_{DM}} evidenciou um alto grau de similaridade entre as sequências. Somente dezesseis mutações pontuais foram identificadas em uma sequência de 807 nucleotídeos, ou seja, diferença de menos de 2%. Desta forma, a sequência de consenso foi utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores de amplificação e clonagem do gene alvo. Os nucleotídeos que codificam os 28 aminoácidos iniciais correspondentes ao peptídeo sinal foram descartados.

4.2. Avaliação da presença do gene *bla*_{N_{DM}} em clones recombinantes de *E. coli* TOP10

Seis clones recombinantes de *E. coli* TOP10 foram selecionados a partir do ágar LB acrescido de canamicina para verificação da presença do gene *bla*_{N_{DM}}. De acordo com a *Colony* PCR realizada com os oligonucleotídeos iniciadores empregados na clonagem, todas as colônias avaliadas apresentaram uma banda com peso molecular de aproximadamente ~ 723 pb (Figura 4.1). Young e colaboradores (2009) descreveram que o gene *bla*_{N_{DM}} era composto por 807 nucleotídeos, portanto o resultado da PCR sugere que gene clonado foi o gene *bla*_{N_{DM}}, haja vista que a diferença de 84 pb pode ser justificada pela ausência da sequência que codifica o peptídeo sinal.

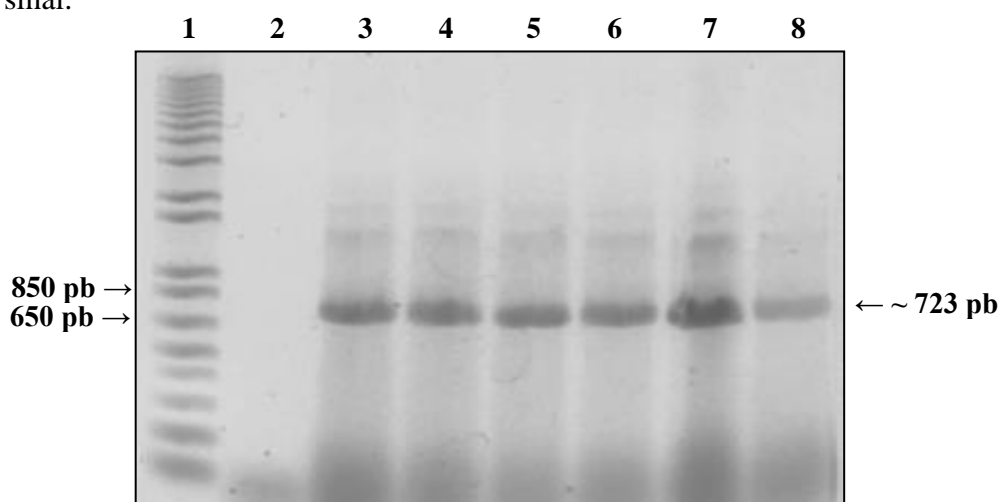


Figura 4.1: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação por PCR realizada a partir de seis colônias recombinantes de *E. coli* TOP10. Uma sequência de aproximadamente 723 pb foi amplificada a partir dos seis clones recombinantes avaliados. 1 = padrão de peso molecular, 2 = branco (ausência de DNA molde na reação), 3 = clone 1, 4 = clone 2, 5 = clone 3, 6 = clone 4, 7 = clone 5, 8 = clone 6.

Uma PCR foi realizada com os oligonucleotídeos iniciadores empregados na clonagem a partir das construções pET28a+*bla*_{NDM} extraídas dos seis clones recombinantes para indicação da presença do gene *bla*_{NDM} no vetor pET28a. Assim como no teste acima, a eletroforese dos produtos da PCR demonstrou a presença de uma banda de aproximadamente 723 pb em todos os seis plasmídeos testados (Figura 4.2).

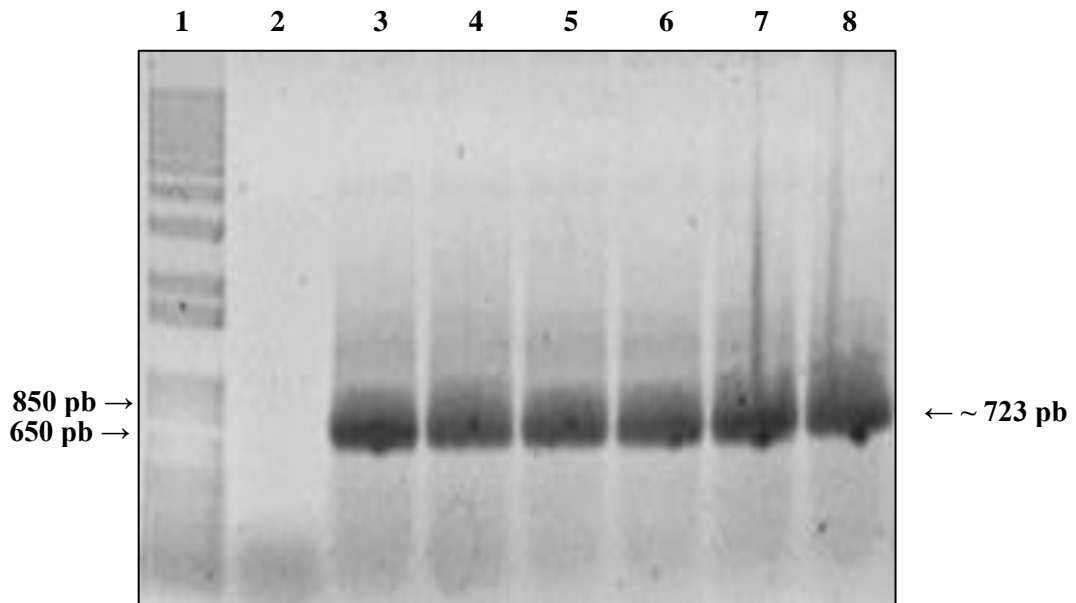


Figura 4.2: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da amplificação por PCR realizada a partir das construções pET28a+*bla*_{NDM} purificadas dos seis clones recombinantes de TOP10. Uma sequência de aproximadamente 723 pb foi amplificada a partir das seis construções avaliadas. 1 = padrão de peso molecular, 2 = branco (ausência de DNA molde na reação), 3 = construção extraída do clone 1, 4 = construção extraída do clone 2, 5 = construção extraída do clone 3, 6 = construção extraída do clone 4, 7 = construção extraída do clone 5, 8 = construção extraída do clone 6.

A eletroforese dos produtos da digestão enzimática dos plasmídeos, extraídos de cada um dos seis clones recombinantes, mais uma vez indicou a presença de um inserto no vetor em todas as seis construções. O peso molecular dos insertos evidenciados na eletroforese era igual ao do gene *bla*_{NDM} purificado utilizado anteriormente nos experimentos de clonagem (Figura 4.3).

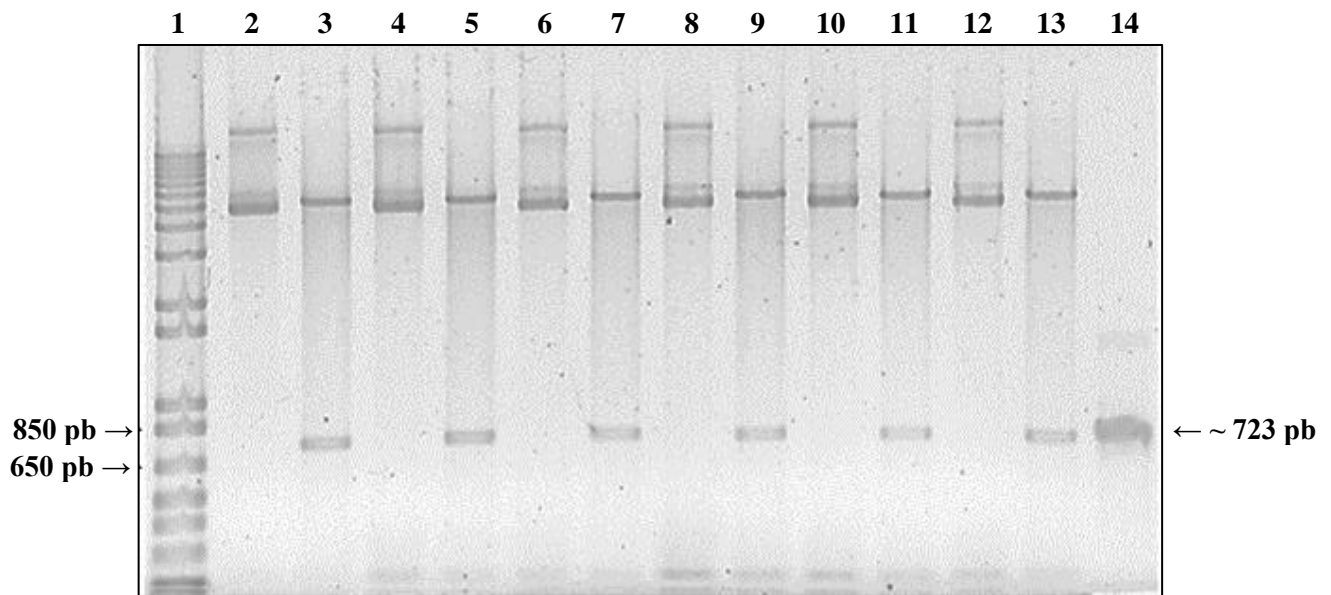


Figura 4.3: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos da digestão das construções pET28a+*bla*_{NDM} extraídas dos seis clones recombinantes e do produto de amplificação de gene *bla*_{NDM} purificado. Todas as construções digeridas liberaram um inserto de mesmo peso molecular (~723 pb) do gene *bla*_{NDM} purificado. 1 = padrão de peso molecular, 2 = construção extraída do clone 1 não digerida, 3 = construção extraída do clone 1 digerida, 4 = construção extraída do clone 2 não digerida, 5 = construção extraída do clone 2 digerida, 6 = construção extraída do clone 3 não digerida, 7 = construção extraída do clone 3 digerida, 8 = construção extraída do clone 4 não digerida, 9 = construção extraída do clone 4 digerida, 10 = construção extraída do clone 5 não digerida, 11 = construção extraída do clone 5 digerida, 12 = construção extraída do clone 6 não digerida, 13 = construção extraída do clone 6 digerida, 14 = produto de amplificação de gene *bla*_{NDM}.

O sequenciamento do gene *bla*_{NDM} purificado a partir dos plasmídeos extraídos de seis clones recombinantes de *E. coli* TOP10 evidenciaram que as construções dos clones 2 e 5 apresentavam mutações pontuais em locais distintos do gene, o que implicava na troca de aminoácido durante a tradução (Figura 4.4). Os plasmídeos extraídos dos clones 1, 3, 4 e 6 não apresentaram mutações e estavam em código de leitura correto. A construção pET28a+*bla*_{NDM} purificada a partir do clone 1 foi selecionada para dar seguimento aos experimentos de expressão protéica.

	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680
1. NDM-TEMPLATE	GCCCGCTCAAGGTATTTACCCGGCCCCGGCCACACCAAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCACGACATCGCTTTGGTGGCTGCTGAAAGGACAGCAAGGCCAAGTCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTA														
Frame 1	G P L K V F Y P P G P G H T S D N I T V G I D G T D I A F G G C L L K D S K A K S L G N L G D A D T E H Y														
2. KP-14	GCCCGCTCAAGGTATTTACCCGGCCCCGGCCACACCAAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCACGACATCGCTTTGGTGGCTGCTGAAAGGACAGCAAGGCCAAGTCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTA														
Frame 1	G P L K V F Y P P G P G H T S D N I T V G I D G T D I A F G G C L L K D S K A K S L G N L G D A D T E H Y														
3. C6	GCCCGCTCAAGGTATTTACCCGGCCCCGGCCACACCAAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCACGACATCGCTTTGGTGGCTGCTGAAAGGACAGCAAGGCCAAGTCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTA														
Frame 1	G P L K V F Y P P G P G H T S D N I T V G I D G T D I A F G G C L L K D S K A K S L G N L G D A D T E H Y														
4. C5	GCCCGCTCAAGGTATTTACCCGGCCCCGGCCACACCAAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCACGACATCGCTTTGGTGGCTGCTGAAAGGACAGCAAGGCCAAGTCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTA														
Frame 1	G P L K V F Y P P G P G H T S D N I T V G I D G T D I A F G G C L L K D S K A K S L G N L G D A D T E H Y														
5. C4	GCCCGCTCAAGGTATTTACCCGGCCCCGGCCACACCAAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCACGACATCGCTTTGGTGGCTGCTGAAAGGACAGCAAGGCCAAGTCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTA														
Frame 1	G P L K V F Y P P G P G H T S D N I T V G I D G T D I A F G G C L L K D S K A K S L G N L G D A D T E H Y														
6. C3	GCCCGCTCAAGGTATTTACCCGGCCCCGGCCACACCAAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCACGACATCGCTTTGGTGGCTGCTGAAAGGACAGCAAGGCCAAGTCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTA														
Frame 1	G P L K V F Y P P G P G H T S D N I T V G I D G T D I A F G G C L L K D S K A K S L G N L G D A D T E H Y														
7. C2	GCCCGCTCAAGGTATTTACCCGGCCCCGGCCACACCAAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCACGACATCGCTTTGGTGGCTGCTGAAAGGACAGCAAGGCCAAGTCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTA														
Frame 1	G P L K V F Y P P G P G H T S D N I T V G I D G T D I A F G G C L L K D S K A K S L G N L G D A D T E H Y														
8. C1	GCCCGCTCAAGGTATTTACCCGGCCCCGGCCACACCAAGTGACAATATCACCGTTGGGATCGACGGCACCACGACATCGCTTTGGTGGCTGCTGAAAGGACAGCAAGGCCAAGTCTCGGCAATCTCGGTGATGCCGACACTGAGCACTA														
Frame 1	G P L K V F Y P P G P G H T S D N I T V G I D G T D I A F G G C L L K D S K A K S L G N L G D A D T E H Y														

	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	
1. NDM-TEMPLATE	GGTGAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAAATGGAACGGCCGACCAACGGTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCAATGCTGGCAGCACACTTCTATCTGCATGCGCGGTTTCGGGGCAGCGCTTCCAACGGTTGATGTCAGGGATGGCGCCGCTGCT																		
Frame 1	G E I R P T I G Q Q M E T G D Q R F G D L V F R Q L A P N V W Q H T S Y L D M P G F G A A S N G L I V R D G G R V L																		
2. KP-14	GGTGAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAAATGGAACGGCCGACCAACGGTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCAATGCTGGCAGCACACTTCTATCTGCATGCGCGGTTTCGGGGCAGCGCTTCCAACGGTTGATGTCAGGGATGGCGCCGCTGCT																		
Frame 1	G E I R P T I G Q Q M E T G D Q R F G D L V F R Q L A P N V W Q H T S Y L D M P G F G A A S N G L I V R D G G R V L																		
3. C6	GGTGAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAAATGGAACGGCCGACCAACGGTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCAATGCTGGCAGCACACTTCTATCTGCATGCGCGGTTTCGGGGCAGCGCTTCCAACGGTTGATGTCAGGGATGGCGCCGCTGCT																		
Frame 1	G E I R P T I G Q Q M E T G D Q R F G D L V F R Q L A P N V W Q H T S Y L D M P G F G A A S N G L I V R D G G R V L																		
4. C5	GGTGAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAAATGGAACGGCCGACCAACGGTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCAATGCTGGCAGCACACTTCTATCTGCATGCGCGGTTTCGGGGCAGCGCTTCCAACGGTTGATGTCAGGGATGGCGCCGCTGCT																		
Frame 1	G E I R P T I G Q Q M E T G D Q R F G D L V F R Q L A P N V W Q H T S Y L D M P G F G A A S N G L I V R D G G R V L																		
5. C4	GGTGAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAAATGGAACGGCCGACCAACGGTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCAATGCTGGCAGCACACTTCTATCTGCATGCGCGGTTTCGGGGCAGCGCTTCCAACGGTTGATGTCAGGGATGGCGCCGCTGCT																		
Frame 1	G E I R P T I G Q Q M E T G D Q R F G D L V F R Q L A P N V W Q H T S Y L D M P G F G A A S N G L I V R D G G R V L																		
6. C3	GGTGAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAAATGGAACGGCCGACCAACGGTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCAATGCTGGCAGCACACTTCTATCTGCATGCGCGGTTTCGGGGCAGCGCTTCCAACGGTTGATGTCAGGGATGGCGCCGCTGCT																		
Frame 1	G E I R P T I G Q Q M E T G D Q R F G D L V F R Q L A P N V W Q H T S Y L D M P G F G A A S N G L I V R D G G R V L																		
7. C2	GGTGAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAAATGGAACGGCCGACCAACGGTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCAATGCTGGCAGCACACTTCTATCTGCATGCGCGGTTTCGGGGCAGCGCTTCCAACGGTTGATGTCAGGGATGGCGCCGCTGCT																		
Frame 1	G E I R P T I G Q Q M E T G D Q R F G D L V F R Q L A P N V W Q H T S Y L D M P G F G A A S N G L I V R D G G R V L																		
8. C1	GGTGAATCCGCCGACGATTGGCCAGCAAAATGGAACGGCCGACCAACGGTTGGCGATCTGGTTTTCCGCCAGCTCGCACCAATGCTGGCAGCACACTTCTATCTGCATGCGCGGTTTCGGGGCAGCGCTTCCAACGGTTGATGTCAGGGATGGCGCCGCTGCT																		
Frame 1	G E I R P T I G Q Q M E T G D Q R F G D L V F R Q L A P N V W Q H T S Y L D M P G F G A A S N G L I V R D G G R V L																		

Figura 4.4: Alinhamento das sequências de nucleotídeos das construções pET28a+*bla*_{NDM} extraídas dos seis clones recombinantes de *E. coli* TOP10, com a sequência de NDM-1 obtida no NCBI (FN396876) (NDM template) e com a sequência de NDM-1 obtida da *K. pneumoniae* CCBH 18797 (KP-14) utilizada para clonagem. A construção extraída do clone 2 apresentava uma mutação na posição 629 pb, acarretando na troca de uma isoleucina por uma treonina. Uma mutação também foi evidenciada na construção extraída do clone 5, que implicava na mudança do aminoácido valina por uma alanina na posição 218 pb.

4.2. Expressão de rNDM em *E. coli* BL-21 STAR™ (DE3) e análise da expressão e solubilidade

Quatro clones recombinantes de *E. coli* BL-21 Star™ (DE3) carregando a construção pET28a+*bla*_{NDM} expressaram uma grande quantidade de proteína, referente à rNDM, com tamanho aproximado de 25 kDa em experimentos de SDS-PAGE (Figura 4.5) quando a expressão foi induzida com IPTG a 37 °C. O tamanho da rNDM está de acordo com Young (2009), cujos experimentos de SDS-PAGE indicaram que a enzima em sua forma monomérica possuía 28 kDa. A pequena diferença de 3 kDa pode ser explicada pela ausência do peptídeo sinal na proteína recombinante deste estudo.

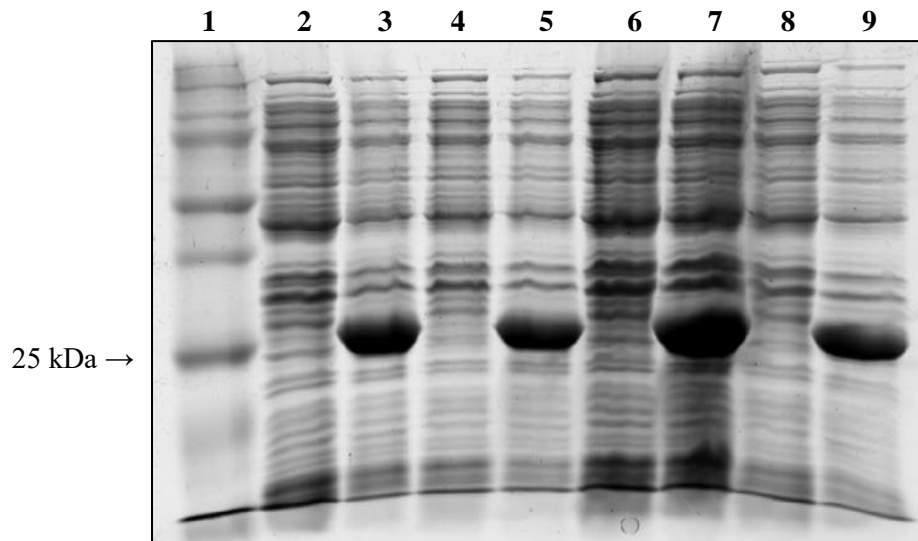


Figura 4.5: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. A análise da expressão de rNDM de quatro clones na condição induzida com IPTG a 37 °C evidenciou que todos os quatro clones recombinantes de *E. coli* BL-21 Star™ (DE3) avaliados produziram grande quantidade de proteína de 25 kDa. 1 = padrão de peso molecular, 2 = lisado bacteriano do clone 1 não induzido, 3 = lisado bacteriano do clone 1 induzido, 4 = lisado bacteriano do clone 2 não induzido, 5 = lisado bacteriano do clone 2 induzido, 6 = lisado bacteriano do clone 3 não induzido, 7 = lisado bacteriano do clone 3 induzido, 8 = lisado bacteriano do clone 4 não induzido, 8 = lisado bacteriano do clone 4 induzido.

Visando avaliar a solubilidade da proteína recombinante, experimentos de indução da expressão com IPTG foram realizados nas temperaturas de 28 e 37 °C. Foi evidenciado que a rNDM é uma proteína solúvel quando a indução da expressão é conduzida a 28 °C, não havendo necessidade de uso de detergente (Figura 4.6).

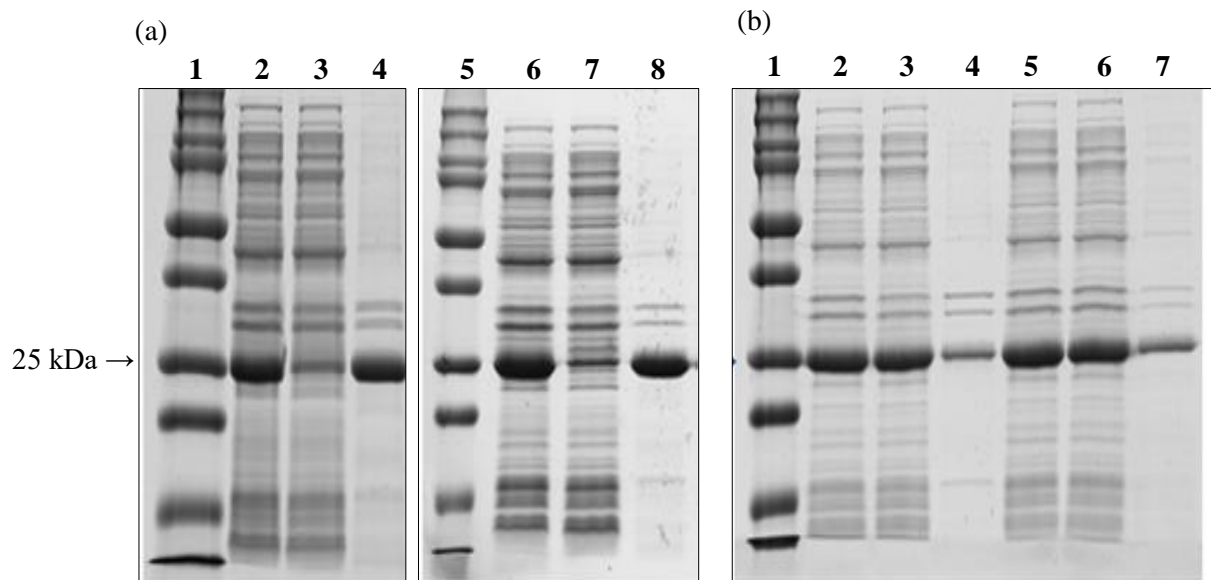


Figura 4.6: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. (a) Perfil de expressão de rNDM na temperatura de 37 °C na ausência e na presença de Triton X-100. A proteína recombinante NDM estava presente na fração insolúvel do lisado bacteriano quando a indução da expressão foi realizada a 37 °C. 1 = padrão de peso molecular, 2 = lisado bacteriano (sem detergente), 3 = fração solúvel do lisado bacteriano (sem detergente), 4 = fração solúvel do lisado bacteriano (sem detergente), 5 = padrão de peso molecular, 6 = lisado bacteriano (com detergente), 7 = fração solúvel do lisado bacteriano (com detergente), 8 =

fração solúvel do lisado bacteriano (com detergente). (b) Perfil de expressão de rNDM na temperatura de 28 °C na ausência e na presença de Triton X-100. A diminuição da temperatura de indução da expressão para 28 °C permitiu que grande quantidade de rNDM fosse expressa de forma solúvel. 1 = padrão de peso molecular, 2 = lisado bacteriano (sem detergente), 3 = fração solúvel do lisado bacteriano (sem detergente), 4 = fração solúvel do lisado bacteriano (sem detergente), 5 = lisado bacteriano (com detergente), 6 = fração solúvel do lisado bacteriano (com detergente), 7 = fração solúvel do lisado bacteriano (com detergente).

Experimentos de indução da expressão da proteína recombinante a 37 °C tiveram como resultado a maior concentração da rNDM na fração insolúvel (Figura 4.6), o que pode ser justificado por uma possível hiperexpressão da proteína devido a presença de um promotor forte no vetor pET28a. Essa condição faz com que proteínas sejam agregadas em velocidade frequentemente muito maior que o enovelamento, além de exigir uma demanda de grande quantidade de chaperonas, que são estruturas que auxiliam no processo de formação da estrutura terciária das proteínas, de forma que esses eventos podem favorecer a agregação de rNDM na forma de corpos de inclusão (Baneyx & Mujacic, 2004; Mamipour et al. 2017). Uma estratégia bastante comum para solucionar problemas relacionados a agregação proteica e formação de corpos de inclusão é a diminuição da taxa de expressão da proteína heteróloga pela *E. coli*. Diferentes abordagens podem ser empregadas para atingir tal objetivo, como diminuição da concentração de IPTG, emprego de promotores mais fracos ou diminuição da temperatura de indução da expressão (Baneyx & Mujacic, 2004).

Neste estudo, a primeira abordagem avaliada, a redução da temperatura para 28 °C, mostrou-se por si só eficiente para a expressão ótima de rNDM, sendo evidenciada pela presença de uma banda grossa referente a proteína recombinante na porção solúvel do lisado bacteriano em experimentos de SDS-PAGE. A presença de uma banda fina na fração insolúvel após indução a 28 °C pode ser justificada por uma má sonicação da suspensão bacteriana, de forma que a NDM pode não ter sido totalmente liberada para o sobrenadante. A presença do detergente Triton X-100 0.5% não proporcionou nenhuma mudança significativa na solubilidade da rNDM, visto que a rNDM, por não possuir o peptídeo sinal, não ficou ancorada no folheto interno da membrana externa como a proteína nativa (González et al, 2016) e por isso ficou majoritariamente localizada na fração solúvel do lisado bacteriano de *E. coli* BL-21 Star™ (DE3).

4.3. Purificação de rNDM

A proteína recombinante NDM foi purificada com elevado grau de homogeneidade. Os picos de proteína, exibidos no cromatograma da purificação por cromatografia de afinidade com *HisTrap*™ HP contendo resina de íons níquel, evidenciaram a presença de grande

quantidade de proteína, que foi eluída da resina quando a concentração de imidazol variou de 30-40% (300-400 mM) (Figura 4.7). A análise de SDS-PAGE das frações 5, 6, 7 e 8 indicou a presença de alta concentração de proteína de aproximadamente 25 kDa, referente à rNDM, e baixa taxa de contaminantes (Figura 4.8).

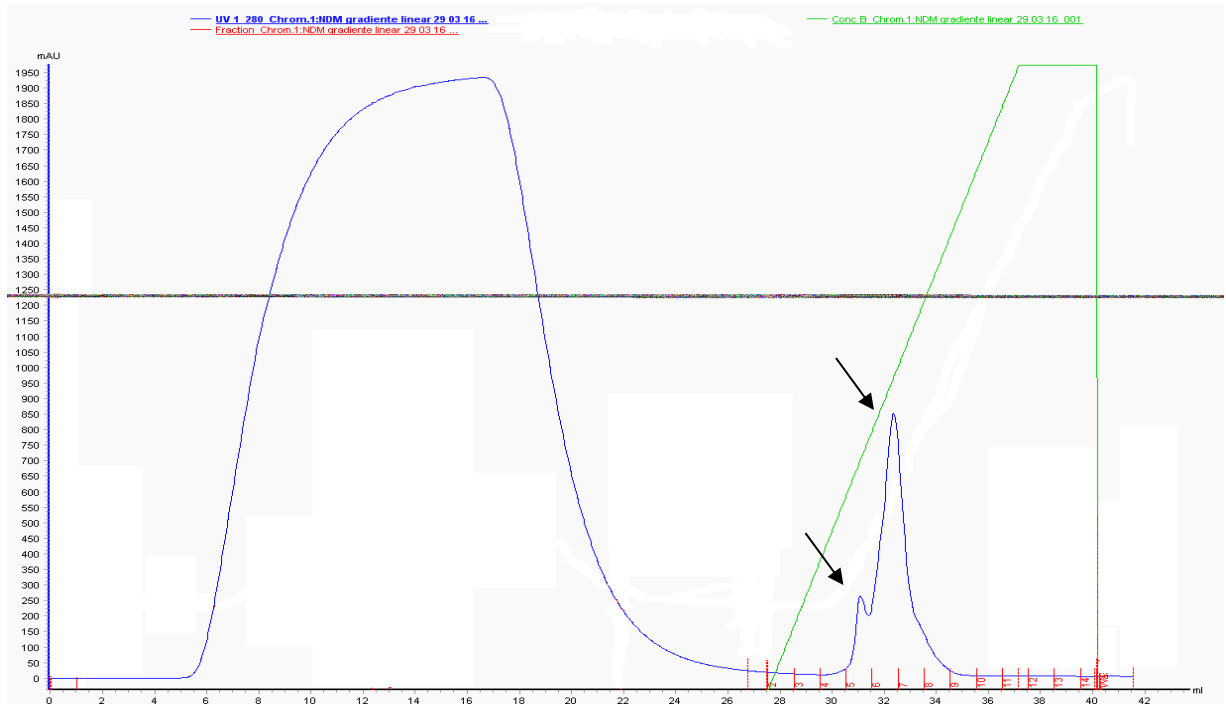


Figura 4.7: Cromatograma da purificação de rNDM por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados com coluna *HisTrap*TM HP contendo resina de íons níquel com um gradiente linear de imidazol 1M (linha verde). Os picos (linha azul - setas pretas) obtidos durante a realização do gradiente evidenciaram grande quantidade de proteína eluída quando aplicados de 30-40% de imidazol.

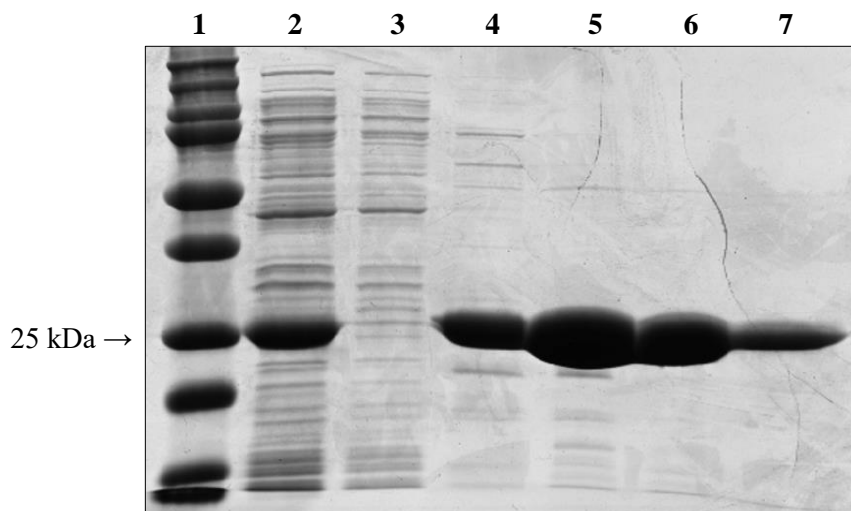


Figura 4.8: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Avaliação das frações 5, 6, 7 e 8 recuperadas da da purificação de rNDM por IMAC evidenciou grande quantidade de proteína de aproximadamente 25 kDa com poucos contaminantes. A ausência de banda grossa de 25 kDa no filtrado obtido da cromatografia mostra que a proteína recombinante permaneceu ligada na resina. 1 = padrão de peso molecular, 2 = fração solúvel do lisado bacteriano aplicada na coluna de cromatografia, 3 = filtrado da cromatografia, 4 = frações 5, 5= fração 6, 6 = fração 7 e 7 = fração 8.

Seguido da remoção dos sais de imidazol e a troca de tampão por cromatografia de gel filtração (Figura 4.9), a quantificação proteica por BCA do material purificado na etapa anterior evidenciou um rendimento de 4.25 mg de rNDM a partir de uma cultura de 30 mL de clones recombinantes de *E. coli* BL-21 STAR™ (DE3) (472.21 µg/mL). A densitometria realizada nas bandas presentes na canaleta do gel de poliacrilamida 12% onde foram aplicados 30 µg de rNDM purificada evidenciou um grau de homogeneidade de aproximadamente 99.86% (Figura 4.10).

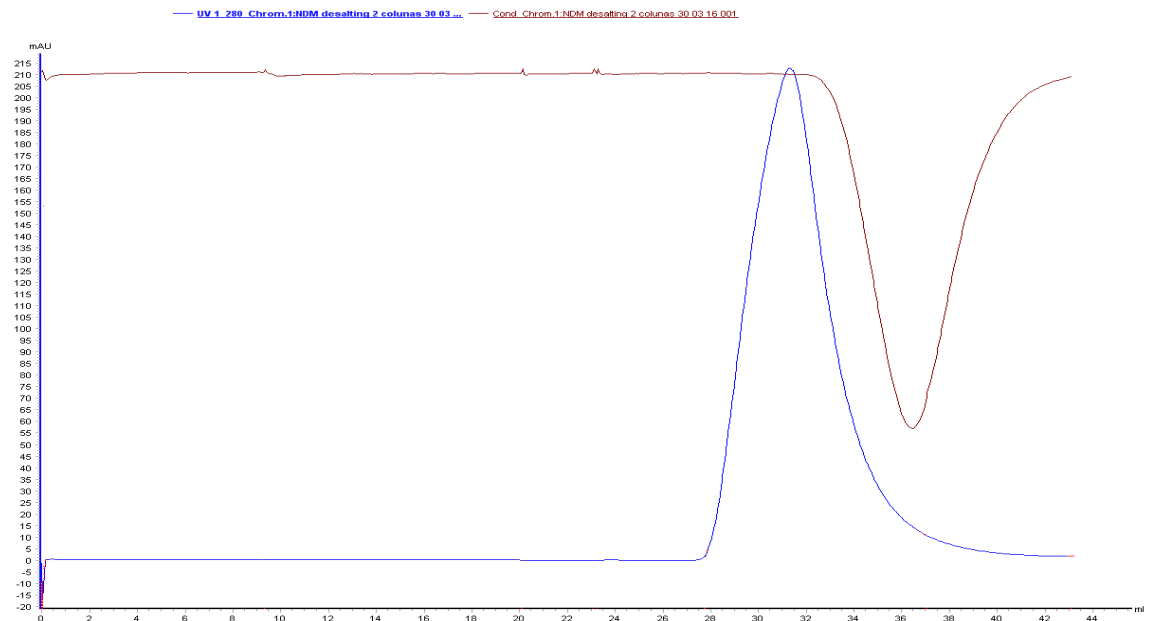


Figura 4.9: Cromatograma da segunda etapa de purificação de rNDM por cromatografia de gel filtração com coluna *HiTrap™ Desalting*. O pico (linha azul) obtido evidenciou grande quantidade de proteína.

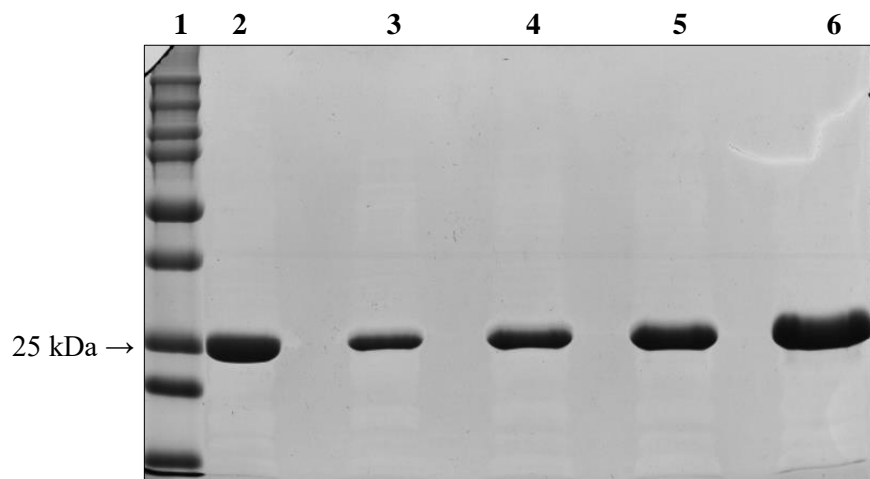


Figura 4.10: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. O SDS-PAGE da rNDM purificada em diferentes concentrações após as duas etapas de cromatografia evidenciou baixa quantidade de contaminantes mesmo com a aplicação de grande quantidade de massa de proteína. A análise de densitometria das bandas aparentes na canaleta onde foram aplicados 30 µg de rNDM purificada evidenciou um grau de homogeneidade de aproximadamente 99.86%. 1 = padrão de peso molecular, 2 = mistura das frações 5, 6, 7 e 8 obtidas por IMAC, 3 = 5 µg rNDM, 4 = 10 µg rNDM, 4 = 20 µg rNDM, 5 = 30 µg rNDM.

4.4. Detecção de proteína recombinante com cauda de polihistidina

A proteína purificada foi identificada como rNDM devido a interação da mesma com um anticorpo contra cauda de polihistidina em experimento de *Western Blot*. Houve o aparecimento de bandas com o mesmo peso molecular (~ 25 kDa) nas canaletas referentes às frações induzidas e naquelas referentes à rNDM, evidenciando que a proteína purificada é o alvo deste estudo. Inclusive, só ocorreram marcações em somente uma banda nas canaletas onde foram aplicadas duas amostras de rNDM purificada, ressaltando a ausência de contaminantes com cauda polihistidina (Figura 4.11).

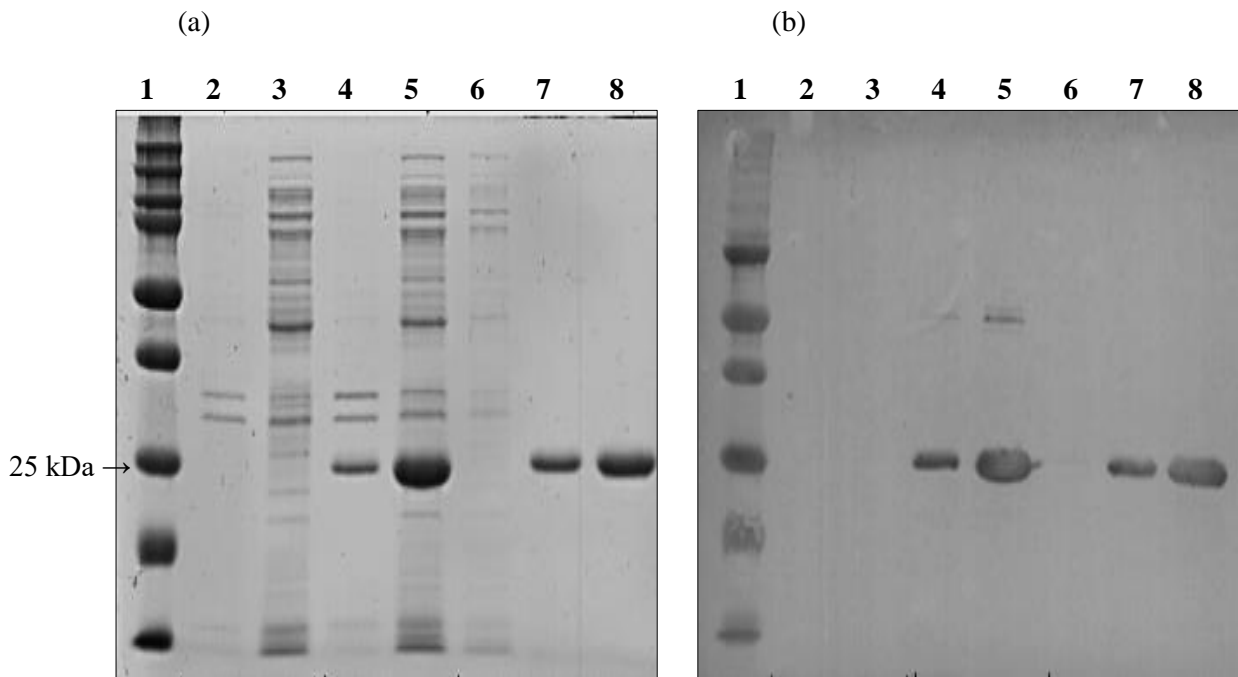
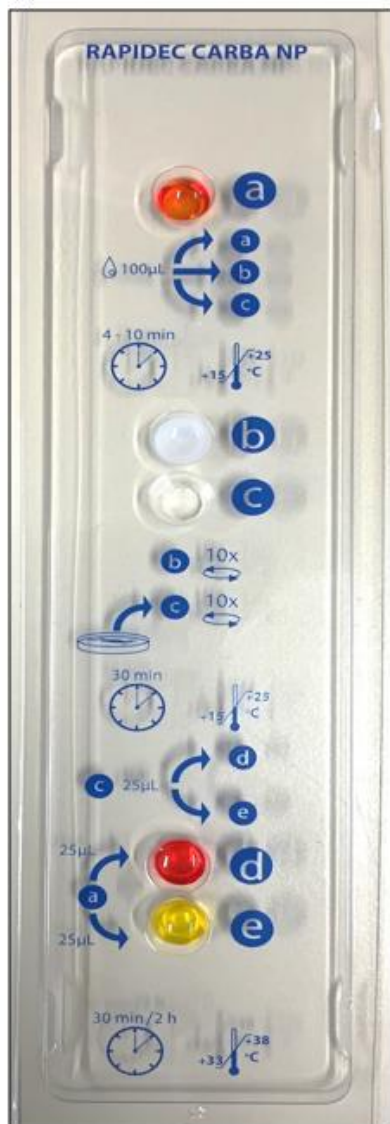


Figura 4.11: (a) Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. (b) Membrana de nitrocelulose. Experimento de *Western Blot* evidenciou que o anticorpo anti-cauda de histidina somente reconheceu uma proteína de 25 kDa, de forma que se pode inferir que a rNDM foi expressa e purificada com sucesso. 1 = padrão de peso molecular, 2 = fração insolúvel do lisado bacteriano não induzido, 3 = fração solúvel do lisado bacteriano não induzido, 4 = fração insolúvel do lisado bacteriano induzido, 5 = fração solúvel do lisado bacteriano induzido, 6 = filtrado obtido com a cromatografia de gel filtração, 7 = 2.5 µg rNDM, 8 = 5 µg rNDM.

4.5. Avaliação biológica da rNDM

A rNDM possui atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos, indicando que é uma enzima recombinante ativa (Figura 4.12a) dependente de cátions divalentes para que exerça sua atividade (Figura 4.12b). Além disso, a avaliação das diluições seriadas de rNDM por Blue Carba mostrou que a proteína possui atividade enzimática em baixas concentrações devido ao resultado positivo do teste quando aplicados aproximadamente 134 ng.

(a)



(b)



Figura 4.12: rNDM possui atividade enzimática. (a) Resultado do RAPIDEC CARBA NP indica a capacidade hidrolítica da rNDM ao ocorrer a mudança de cor para amarelo da solução no poço E. (b) Resultados do Blue Carba mostram no tubo A que não há mudança de pH na ausência de imipenem, no tubo B que a rNDM hidrolisou o antimicrobiano culminando na acidificação da solução e no tubo C que a enzima foi inibida pela presença de EDTA.

4.6. Determinação do título de anticorpos no soro policlonal anti-rNDM

A avaliação do potencial de ligação dos anticorpos presentes no soro hiperimune, coletado após a terceira dose de imunização, por ELISA indicou que os mesmos foram capazes de reconhecer e se ligar a rNDM até a diluição de 1/25600 do soro (Figura 4.13). A D.O. obtida com o soro pré-imune foi utilizada como *cut off*, ou seja, somente as diluições com D.O. acima daquela obtida pelo soro pré imune foram consideradas como reativas.

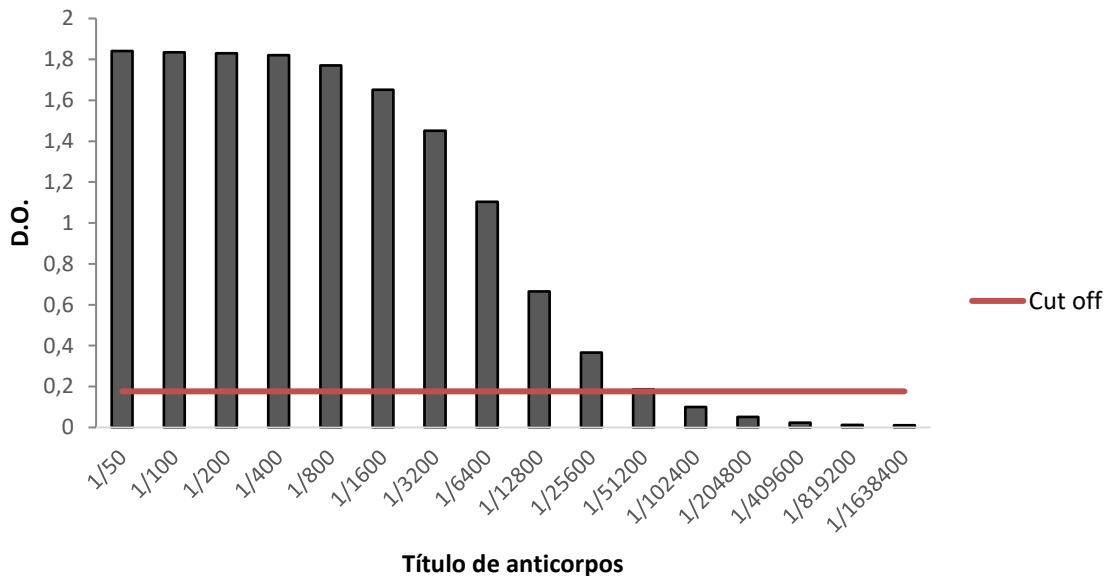


Figura 4.13: O título de anticorpos presentes no soro hiperimune anti-rNDM coletado após a terceira dose foi de 1/25600 em ensaio de ELISA. A densidade óptica obtida com o soro pré-imune foi utilizada como *cut off*.

4.7. Avaliação do processo de purificação de IgG a partir do soro hiperimune

A purificação de IgG a partir do soro policlonal hiperimune por cromatografia de troca iônica foi eficiente na separação de IgG (comumente eluída na concentração de 18-22% de NaCl) e de albumina (eluída com NaCl na concentração de 50%), um frequente contaminante de amostras de soro que deve ser retirado para evitar transtornos no desenvolvimento do teste imunocromatográfico.

Dois *pools* contendo as frações de IgG (F3 e F4) resultantes de três corridas cromatográficas de troca iônica foram obtidos. As frações foram eluídas em gradiente de aproximadamente 20% de NaCl (Figura 4.14). Os *pools* F3 e F4 possuíam concentração protéica total de 0,8 e 1 mg/mL e apresentaram poucos contaminantes após serem avaliados por eletroforese em gel de poliacrilamida. As frações F3 e F4 apresentaram baixa presença de contaminantes por SDS-PAGE, indicando um processo de purificação eficiente. A fração F3 foi selecionada para dar seguimento aos experimentos posteriores, visto que apresentou um

maior grau de homogeneidade, evidenciando somente duas bandas referentes às cadeias leve e pesada da imunoglobulina (Figura 4.15).

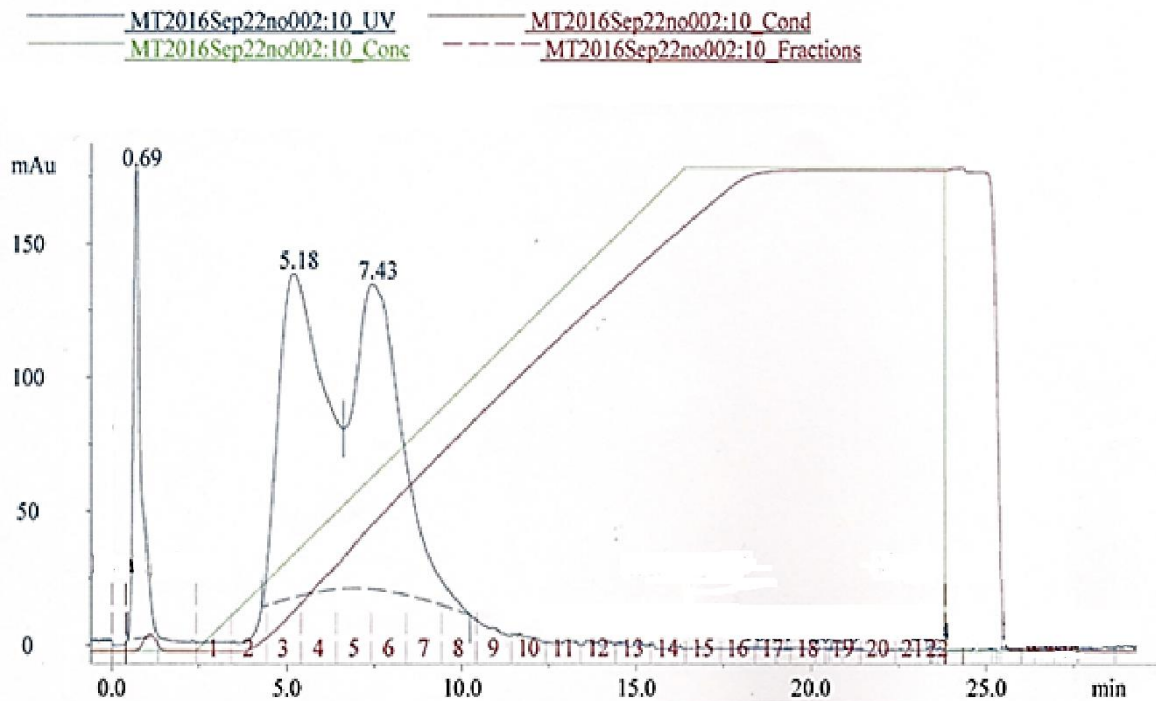


Figura 4.14: Cromatograma da purificação de IgG do soro hiperimune por cromatografia de troca iônica. As frações F3 e F4 correspondem às imunoglobulinas do tipo G e foram eluídas em gradiente de aproximadamente 20% de NaCl.

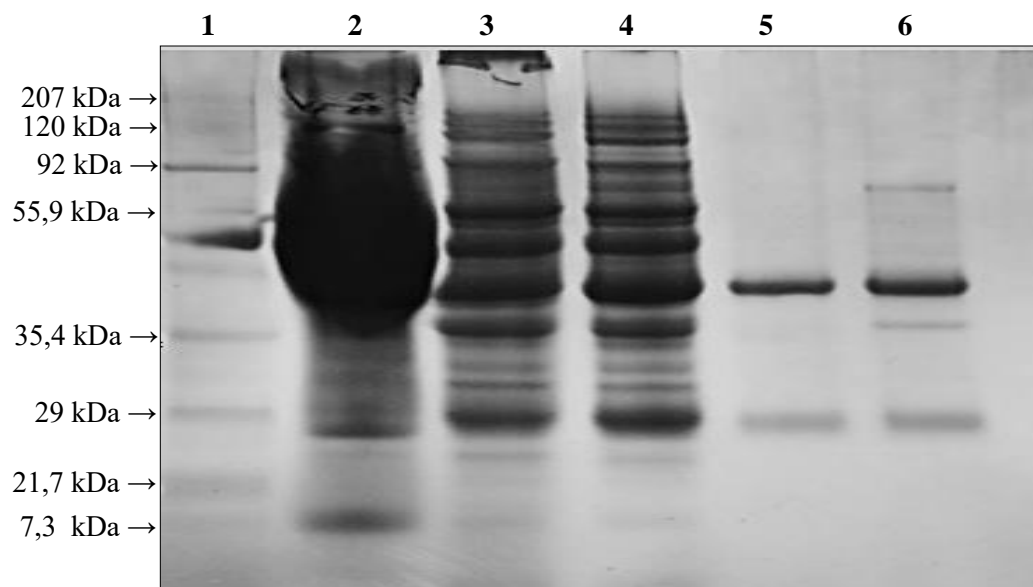


Figura 4.15: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Baixa presença de contaminantes nas frações F3 e F4, quando comparadas ao perfil de proteínas no soro de coelho e nas alíquotas de processos anteriores à cromatografia de troca iônica, evidenciando um processo de purificação eficiente. PM = padrão de peso molecular; 1 = soro de coelho bruto; 2 = amostra ressuspensa pós-precipitação $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3 = amostra pós cromatografia de gel filtração em PD10; 4 = mistura de frações F3 pós-cromatografia de troca iônica; 5 = mistura de frações F4 pós-cromatografia de troca iônica.

4.8. Avaliação do potencial de reconhecimento de NDM pela IgG e determinação do limite de detecção de NDM em lisado bacteriano

Na padronização do ELISA com a rNDM, foi verificado que a condição com emissão de maior D.O. seria utilizando 200 ng de IgG anti-rNDM aderida por poço na microplaca e com o uso de IgG anti-rNDM conjugada a peroxidase a 1/2000 para detecção de 1 µg de rNDM em 100 µL de diluente de amostra/conjugado (Bio-Manguinhos).

Com a obtenção do ELISA padronizado para detecção de rNDM, o mesmo foi avaliado frente a amostras bacterianas produtoras de NDM e outras carbapenemases. Em relação aos testes de tampão de lise, o *Suspension Medium* (bioMérieux) se mostrou ineficiente na solubilização da proteína nativa nas amostras bacterianas, somente a proteína recombinante foi reconhecida pelo anticorpo. A D.O. detectada nos poços contendo os lisados de *K. pneumoniae* CCBH 18797 era similar a detectada nos poços controle em que não houve aplicação de amostras. Uma possível justificativa para esse obstáculo seria a acessibilidade do anticorpo à NDM na amostra bacteriana que, em seu estado nativo, se encontra ancorada no folheto interno da membrana externa (González et al. 2016), justificando a necessidade de detergentes no tampão.

Com a ineficácia do *Suspension Medium* (bioMérieux), um novo teste foi realizado utilizando diferentes concentrações dos detergentes SDS e Triton X-100 no diluente de amostra/conjugado (Bio-Manguinhos). Além disso, neste novo teste foram utilizados 400 ng de IgG anti-rNDM por poço e de IgG anti-rNDM conjugada a peroxidase a 1/1.000. O detergente mais eficiente na solubilização de NDM foi o Triton X-100, tendo sido o componente usado por Gonzalez e colaboradores (2016) em experimentos de *Western blotting* para detecção de NDM e em tampão de migração de teste imunocromatográfico para detecção de 6'-N-acetiltransferase (Kitao et al. 2010). O uso de Triton X-100 em Teste de Hogde Modificado também está relacionado com o aumento da sensibilidade do teste na detecção de bactérias produtoras de NDM (Pasteran et al. 2015). A D.O. detectada em poços inoculados com *K. pneumoniae* CCBH 18797 lisada com as diferentes concentrações de Triton X-100 foi muito similar, demonstrando que o detergente era eficiente na concentração de 0.1%. No entanto, como somente uma amostra produtora de NDM foi avaliada nesta padronização, além da existência de outros estudos indicando o uso de Triton X-100 a 1% (Kitao et al. 2010; González et al. 2016), esta foi a concentração escolhida para ser utilizada em experimentos posteriores. O detergente SDS utilizado não foi eficiente para extrair a NDM da membrana externa, possivelmente pela formação de OMVs após a lise bacteriana que, por sua vez, escondiam e impediam o reconhecimento de NDM pela IgG anti-rNDM.

Após a padronização do ELISA para detecção de NDM nos controles positivo e negativo utilizando 400 ng de IgG anti-rNDM aderida por poço, IgG anti-rNDM conjugada a peroxidase a 1/1000 e diluente de amostra/conjugado (Bio-Manguinhos) acrescido de Triton X-100 1%, o teste empregado para avaliação de bactérias produtoras de NDM e outras carbapenemases. O ELISA padronizado demonstrou que a IgG purificada anti-rNDM era altamente eficaz no reconhecimento da proteína recombinante e da proteína nativa em todas as amostras clínicas produtoras de NDM testadas. Inclusive demonstrando sua capacidade de detecção de NDM em diferentes espécies, como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *M. morgannii*, *E. coli*, *P. stuartii* e *C. freundii*. Não houve reações cruzadas com outras amostras bacterianas produtoras de enzimas de outras famílias de carbapenemases como VIM, SPM, KPC ou OXA (Figura 4.16), nem mesmo com o controle negativo. A D.O. obtida com a *E. coli* BL-21 STAR™ (DE3) foi utilizada como *cut off*, pois é uma bactéria conhecida pela ausência de produção de β -lactamases.

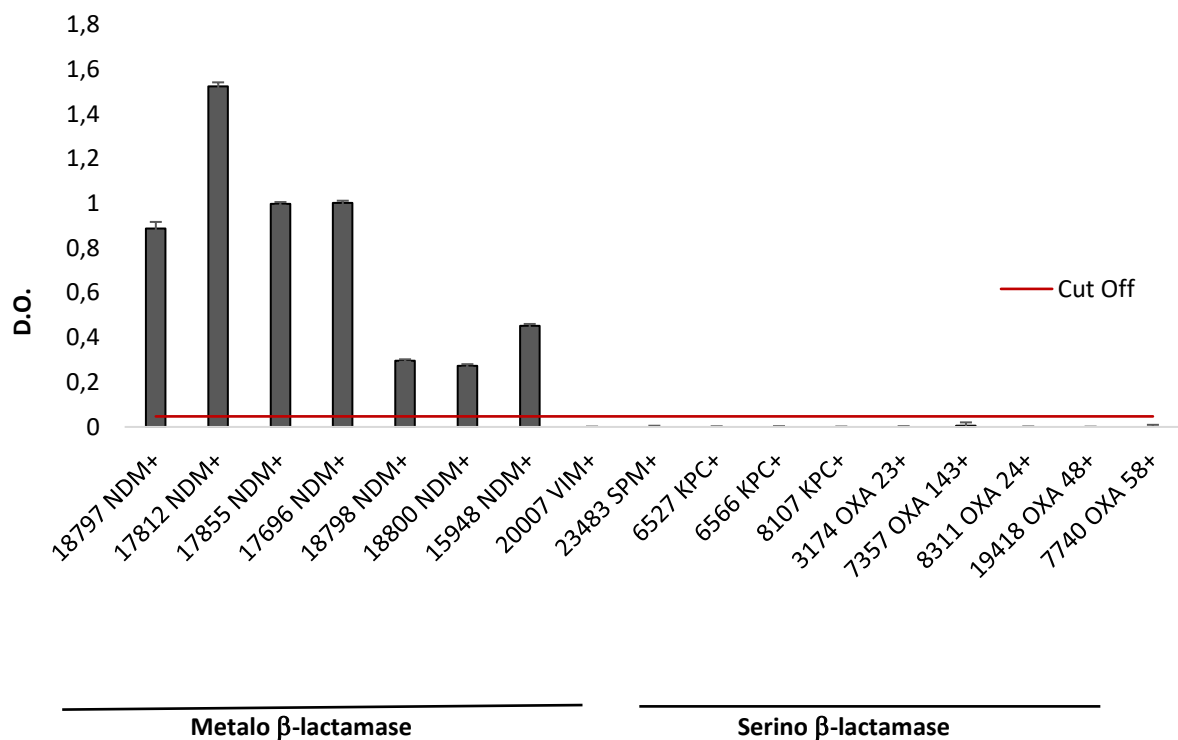


Figura 4.16: Detecção de NDM em amostras clínicas pela IgG anti-rNDM por ELISA. A IgG anti-rNDM foi capaz de detectar todas as amostras bacterianas produtoras de NDM com variedade da densidade ótica e não apresentou reação cruzada com nenhuma das amostras produtoras de outras carbapenemases. O *cut off* foi determinado pela densidade ótica obtida com a *E. coli* BL-21 STAR™ (DE3).

Portanto, a IgG anti-rNDM demonstrou ter um excelente potencial de detecção de diferentes espécies bacterianas produtoras de NDM devido a sua especificidade e sensibilidade de 100% em experimentos de ELISA.

Uma possível justificativa para a variabilidade na D.O. nas amostras clínicas produtoras de NDM seria a variabilidade de plasmídeos (diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial: IncFIC, IncA/C e IncK, por exemplo) e ambientes genéticos em que o gene *bla_{NDM}* já foi detectado (Wailan et al. 2015; Huang et al. 2016) visto que poderiam estar relacionados com diferenças nos níveis de expressão de NDM entre as diferentes espécies, cepas ou também pela variação do número de cópias do gene *bla_{NDM}* (Paul et al. 2017). Na Figura 4.12 pode-se notar que a *M. morgannii* CCBH 17812 teve a maior D.O. enquanto que *P. stuartii* CCBH 18800 e *E. coli* CCBH 18798 tiveram as menores. Outra possível justificativa para essa variabilidade seria a dificuldade de estabelecer uma escala 1 MacFarland ideal para todas as amostras a serem testadas, pois por ser um método visual, está sujeito a diferentes percepções de turbidez.

O limite de detecção de NDM pela IgG anti-rNDM em lisado do controle positivo *K. pneumoniae* CCBH 18797 foi de 1:32 (Figura 4.17). Considerando que a escala 1 de MacFarland apresenta aproximadamente 30 milhões de células bacterianas, pode-se estimar que a IgG anti-rNDM é capaz de reconhecer NDM em uma suspensão contendo aproximadamente 1 milhão de bactérias por ELISA.

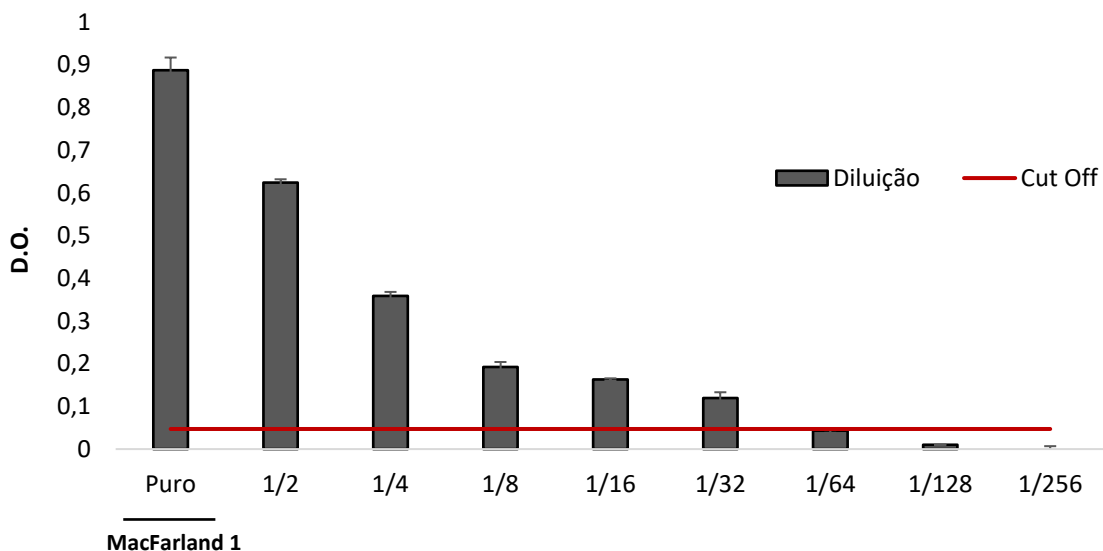


Figura 4.17: Limite de detecção de NDM em lisado bacteriano por IgG anti-rNDM por ELISA foi de 1:32. O *cut off* foi determinado pela densidade óptica obtida com a *E. coli* BL-21 STAR™ (DE3).

4.9. Determinação do melhor cruzamento de teste imunocromatográfico para detecção de NDM

4.9.1. Primeira padronização com rNDM

Na avaliação dos cruzamentos na primeira padronização, a membrana de nitrocelulose de 3 μc apresentou o maior número de testes positivos para detecção de 1 μg de rNDM com o uso de 100 μL de tampão TMI + Triton X-100 1%. O cruzamento 9 apresentou a linha teste com maior intensidade em relação aos outros cruzamentos, apesar de estar muito mais fraca quando comparada a linha controle. Somente os cruzamentos 14, 15, 16 17 e 18 desenvolvidos com membrana de nitrocelulose de 10 μc foram positivos. Não houve aparecimento de linhas referentes à detecção de rNDM nos testes com membrana de nitrocelulose de 15 μc (Tabela 4.1). Membranas com poros de menor tamanho estão relacionadas com o aumento da capacidade de ligação do antígeno ao anticorpo (Peng et al. 2008), o que explica a maior sensibilidade de detecção de rNDM nos cruzamentos compostos por membranas de 3 μc .

Houve presença de marcações inespecíficas na região da linha teste nos cruzamentos quando só se utilizava o tampão TMI + Triton X-100 1%. A adição de uréia no tampão TMI + Triton X-100 1% só foi eficiente para eliminar a marcação inespecífica na concentração de 2 M nos cruzamentos 9, 18 e 27 testados (Figura 4.18). A avaliação de rNDM em concentrações de 3 e 6 μg com o tampão TMI + Triton X-100 1% + uréia 2 M demonstrou que somente o cruzamento 9 era eficiente na detecção de rNDM, sendo a linha teste mais forte com o uso de rNDM a 3 μg . Segundo estudo de Qian e Bau (2003), a intensidade da linha teste é comprometida quando um excesso de amostra é aplicado em dispositivos de fluxo lateral. Nesta situação, tanto a proteína recombinante livre quanto rNDM ligada ao conjugado seriam capturadas pelos anticorpos impregnados na membrana de nitrocelulose e a intensidade da banda estaria relacionada com a quantidade de anticorpos conjugados presentes.

Tabela 4.1: Avaliação dos cruzamentos da primeira padronização para detecção de 1 µg de rNDM com tampão TMI + Triton X-100 1%. Todos os cruzamentos construídos com membrana de 3 µc foram positivos, enquanto que somente os cruzamentos 14, 15, 16 17 e 18 desenvolvidos com membrana de 10 µc foram positivos. Todos os cruzamentos com membrana de 15 µc foram negativos. Em todos os cruzamentos houve marcação na linha controle.

Nº do cruzamento	Porosidade de membrana de nitrocelulose (µc)	Fluxo de impreganação de anticorpo purificado na membrana de nitrocelulose (µL/mm)	Fluxo de impreganação de anticorpo conjugado a ouro coloidal na membrana do conjugado (µL/mm)	Resultado da avaliação com rNDM
1	3	0.04	0.20	+
2	3	0.04	0.30	+
3	3	0.04	0.40	+
4	3	0.06	0.20	+
5	3	0.06	0.30	+
6	3	0.06	0.40	+
7	3	0.08	0.20	+
8	3	0.08	0.30	+
9	3	0.08	0.40	+
10	10	0.04	0.20	-
11	10	0.04	0.30	-
12	10	0.04	0.40	-
13	10	0.06	0.20	-
14	10	0.06	0.30	+
15	10	0.06	0.40	+
16	10	0.08	0.20	+
17	10	0.08	0.30	+
18	10	0.08	0.40	+
19	15	0.04	0.20	-
20	15	0.04	0.30	-
21	15	0.04	0.40	-
22	15	0.06	0.20	-
23	15	0.06	0.30	-
24	15	0.06	0.40	-
25	15	0.08	0.20	-
26	15	0.08	0.30	-
27	15	0.08	0.40	-



Figura 4.18: Avaliação do tampão TMI + Triton X-100 1% com diferentes concentrações de uréia no cruzamento 9. (a) TMI + Triton X-100 1% + uréia 0.250 M, (b) TMI + Triton X-100 1% + uréia 0.150 M, (c) TMI + Triton X-100 1% + uréia 0.5 M, (d) TMI + Triton X-100 1% + uréia 1 M e (e) TMI + Triton X-100 1% + uréia 2 M. Presença de marcações inespecíficas na região da linha teste no cruzamento 9 com TMI + Triton X-100 1% acrescido de 0.150 a 1 M de uréia. Ausência da marcação com TMI + Triton X-100 1% adicionado de uréia 2 M.

A avaliação do cruzamento 9, com a coleta de massa bacteriana do controle negativo e controle positivo através de alças bacteriológicas de 1 e 5 μL e posterior suspensão em 100 μL de tampão TMI + Triton X-100 1% + uréia 2 M, apresentou dificuldade de absorção das amostras pela membrana da amostra e dificuldade de migração das mesmas pela membrana de nitrocelulose. Uma possível explicação para esse problema seria a obstrução da membrana da amostra pelos debris celulares ou por uma grande viscosidade do lisado bacteriano. O uso de alças bacteriológicas de 5 e 10 μL na coleta de massa bacteriana propiciava a marcação inespecífica na linha teste na avaliação do controle negativo. A adição de 0.5% e 1% detergente Tween 20 no tampão TMI + Triton X-100 1% + uréia 2 M não influenciou nos resultados obtidos anteriormente, assim como os tempos de incubação da amostra no tampão de migração. Por sua vez, o aumento de volume de tampão TMI + Triton X-100 1% + uréia 2 M empregado suspensão da massa bacteriana para 500 μL (aplicação de 100 μL no teste) melhorou a migração da amostra, no entanto a membrana de nitrocelulose continuou com resquícios da migração (migração “suja”) e a marcação na linha teste com o uso do controle positivo apresentou-se muito discreta.

O tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM apresentou resultados semelhantes ao tampão TMI + Triton X-100 1% + uréia 2 M usado anteriormente, com marcações fracas na linha teste quando uma colônia foi ressuspensa em 500 μL do tampão (aplicação de 100 μL no teste). Contudo, o tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM foi escolhido para ser usados nos próximos testes por ter sido mais eficiente na solubilização de NDM da membrana externa de *A. baumannii* CCBH 17959. O uso de NaCl para extração de carbapenemases produzidas por *Acinetobacter* sp. já foi avaliado por Dortet e colaboradores (2014b) para otimização do teste Carba NP. Neste estudo, foi visto que o componente com propriedades osmóticas acarretou em uma lise bacteriana mais eficiente, levando ao aumento da sensibilidade do teste.

4.9.2. Segunda padronização com rNDM

Na segunda padronização utilizando maiores quantidades de anticorpo de captura e com uso do tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM, todos os cruzamentos construídos com membrana de 3 μc foram positivos. Somente os cruzamentos 10.1 e 13.1 desenvolvidos com membrana de 10 μc foram negativos (Tabela 4.2). Os cruzamentos 9.1 e 18.1 foram os que apresentaram marcações na linha teste de maior intensidade quando testados com rNDM a 3 μg (Figura 4.19).

Na avaliação com o controle positivo, diluindo uma colônia em 500 μ L de tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM (aplicação de 100 μ L no teste), não houve marcação na linha teste nos cruzamentos 9.1 e 18.1. O cruzamento 9.1 mostrou resultado positivo, com linha teste com maior intensidade que o 18.1, quando três colônias foram suspensas em 150 μ L do tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM e todo o conteúdo fora aplicado no teste. A avaliação do cruzamento 9.1 com cinco colônias do controle positivo em 150 μ L do tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM apresentou marcação na linha teste ainda mais intensa que no teste anterior com três colônias (Figura 4.20).

Tabela 4.2: Avaliação dos cruzamentos da segunda padronização para detecção de 3 μ g de rNDM com tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM. Todos os cruzamentos construídos com membrana de 3 μ c foram positivos. Enquanto que somente os cruzamentos 10.1 e 13.1 desenvolvidos com membrana de 10 μ c foram negativos. Em todos os cruzamentos houve marcação na linha controle.

Nº do cruzamento	Porosidade de membrana de nitrocelulose (μ c)	Fluxo de impreganação de anticorpo purificado na membrana de nitrocelulose (μ L/mm)	Fluxo de impreganação de anticorpo conjugado a ouro coloidal em membrana de fibra de vidro (μ L/mm)	Resultado da avaliação com rNDM
1.1	3	0.04	0.20	+
2.1	3	0.04	0.30	+
3.1	3	0.04	0.40	+
4.1	3	0.06	0.20	+
5.1	3	0.06	0.30	+
6.1	3	0.06	0.40	+
7.1	3	0.08	0.20	+
8.1	3	0.08	0.30	+
9.1	3	0.08	0.40	+
10.1	8	0.04	0.20	-
11.1	8	0.04	0.30	+
12.1	8	0.04	0.40	+
13.1	8	0.06	0.20	-
14.1	8	0.06	0.30	+
15.1	8	0.06	0.40	+
16.1	8	0.08	0.20	+
17.1	8	0.08	0.30	+
18.1	8	0.08	0.40	+



Figura 4.19: Cruzamento 9.1 testado com rNDM a 3 µg em tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM apresentou marcação com cor forte na linha teste.

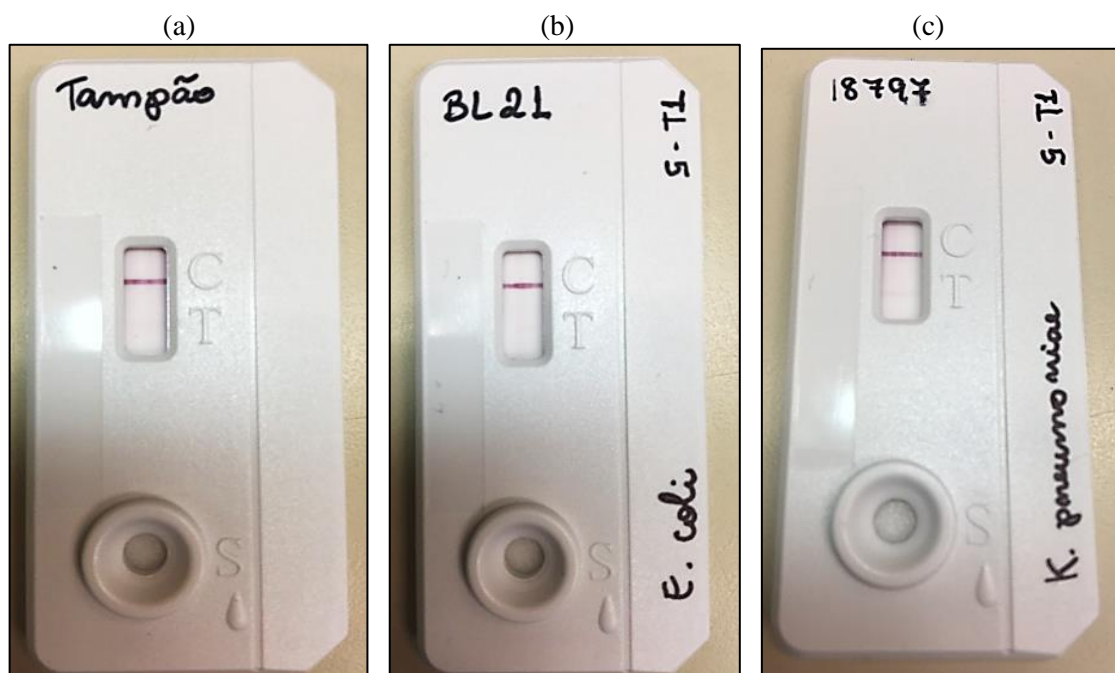


Figura 4.20: Cruzamento 9.1 testado com (a) somente o tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM, (b) controle negativo e (c) controle positivo. Houve marcação na linha teste somente no controle positivo.

Na avaliação do cruzamento 9.1 com maior número de colônias, houve aparecimento de marcações tênues inespecíficas na linha teste quando o controle negativo era testado. Portanto, o cruzamento 9.1 foi o escolhido para avaliação com amostras bacterianas produtoras de NDM e de outras carbapenemases pela sua melhor eficiência na detecção de NDM a partir de cinco colônias do controle positivo em 150 µL de tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM.

A diferença entre os cruzamentos 9.1 e 18.1 foi a maior quantidade de anticorpo impregnado na membrana de nitrocelulose no primeiro (1 mg), justificando a sua maior sensibilidade. A impregnação de 1 mg de anticorpo na membrana de nitrocelulose foi uma condição utilizada com sucesso para aumento da sensibilidade para detecção de OXA-23 em teste imunocromatográfico por Ji e colaboradores (2016).

Houve presença de marcações na linha teste do cruzamento 9.1 até a última diluição de rNDM com o uso de tampão de migração Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM realizada (1:16.384). Portanto, o teste imunocromatográfico padronizado neste estudo possui baixo limite de detecção da proteína recombinante, sendo capaz de detectá-la a aproximadamente 200 pg.

4.9.3. Resultado da avaliação preliminar do teste imunocromatográfico com outras amostras bacterianas

O teste imunocromatográfico foi capaz de detectar a presença de NDM nas amostras bacterianas *A. berezeniae* CCBH 15865, *C. freundii* CCBH 19717, *P. rettgeri* CCBH 19720 e *A. baumannii* CCBH 17959. Houve o aparecimento de linha teste com forte intensidade quando as amostras *A. berezeniae* CCBH 15865 e *C. freundii* CCBH 18717 foram testadas, tendo a primeira amostra resultado bastante semelhante ao teste com 3 µg de rNDM. Por outro lado, as amostras *P. rettgeri* CCBH 19720 e *A. baumannii* CCBH 17959 apresentaram linhas teste mais fracas em relação às anteriores (Figura 4.21).

A variabilidade de intensidade nas marcações para diferentes espécies pode ser justificada pelo mesmo motivo explicado para a variação de D.O. para as amostras testadas por ELISA, como diferentes contextos genéticos de NDM publicados na literatura científica e diferença no número de cópias (Wailan et al. 2015; Huang et al. 2016; Paul et al. 2017), além da distinção da morfologia colonial entre as espécies. Muitos artigos científicos da literatura sobre testes imunocromatográficos para detecção de determinantes de resistência aos antimicrobianos não especificam a quantidade de colônias avaliadas (Ji et al. 2014, 2016; Kitao et al. 2010, 2011), indicando que pode haver uma variedade na quantidade de colônias aplicadas no teste dependendo do tipo de meio e condição utilizada para o crescimento bacteriano e também pelas diferenças nos tamanhos das colônias.

Outra explicação para a baixa intensidade da linha teste nas amostras produtoras de NDM seria a baixa concentração da proteína nativa no lisado, o que permitiria a ocorrência de sua saturação com os anticorpos conjugados, impedindo que existam sítios livres da proteína para serem reconhecidos pelo anticorpo de captura. Uma estratégia que ainda poderia ser

abordada para melhorar o desempenho do teste imunocromatográfico para detecção de NDM no lisado bacteriano seria diminuir a quantidade de anticorpo conjugado haja vista que a estratégia de aumentar a quantidade de massa colonial não foi efetiva pelo aumento da viscosidade do material a ser analisado, dificultando a absorção pela membrana de amostra e a migração pela membrana de nitrocelulose (O'Farrel, 2013).

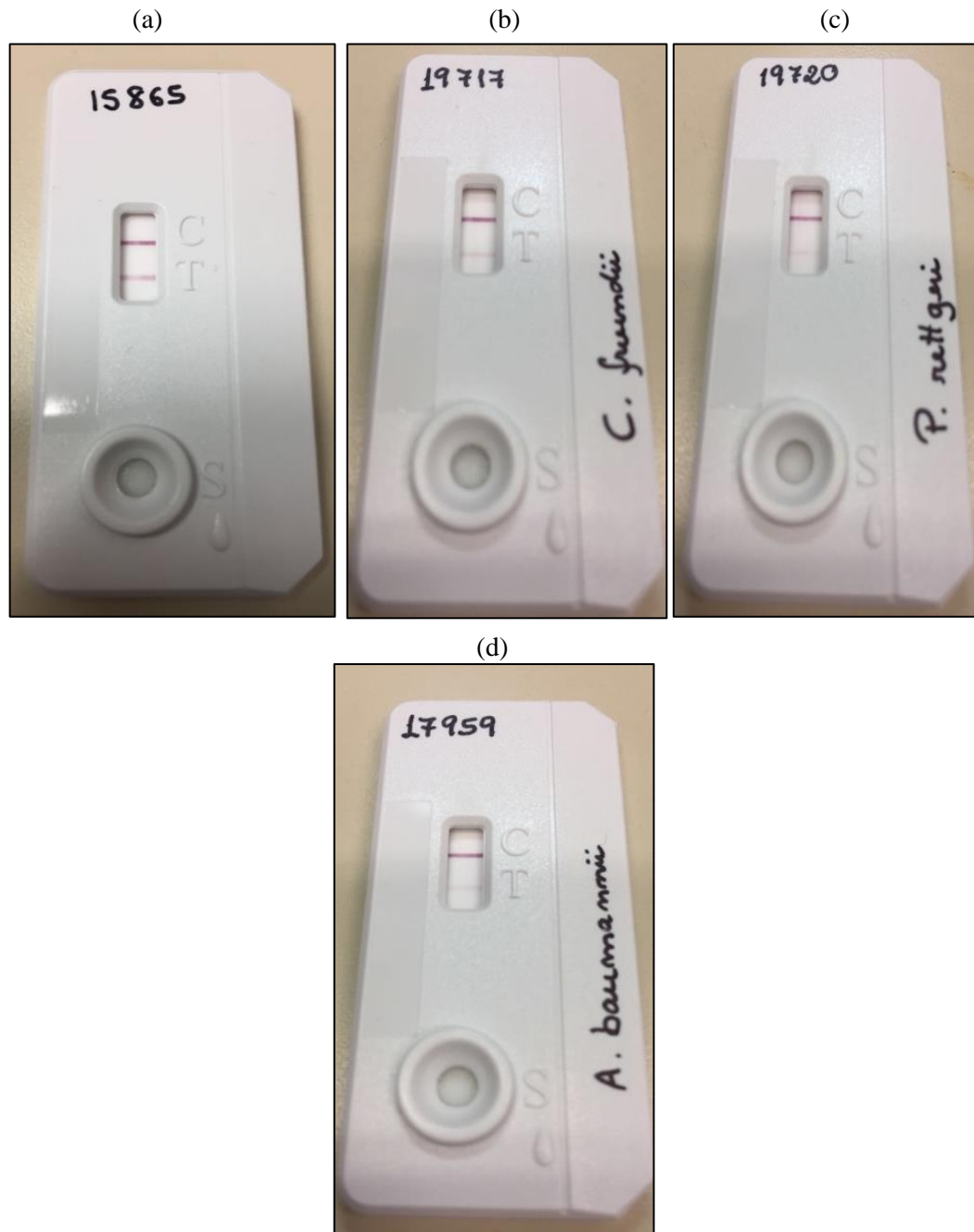


Figura 4.21: Avaliação do cruzamento 9.1 com colônias de (a) *A. berezeniae* CCBH 15865, (b) *C. freundii* CCBH 18717, (c) *P. rettgeri* CCBH 19720 e (d) *A. baumannii* CCBH 17959 diluídas em tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM. Todas as amostras testadas foram positivas.

Na avaliação do teste imunocromatográfico padronizado frente a amostras produtoras de outras carbapenemases (KPC, VIM, IMP, SPM e OXAs), todas foram negativas (Figura 4.22).

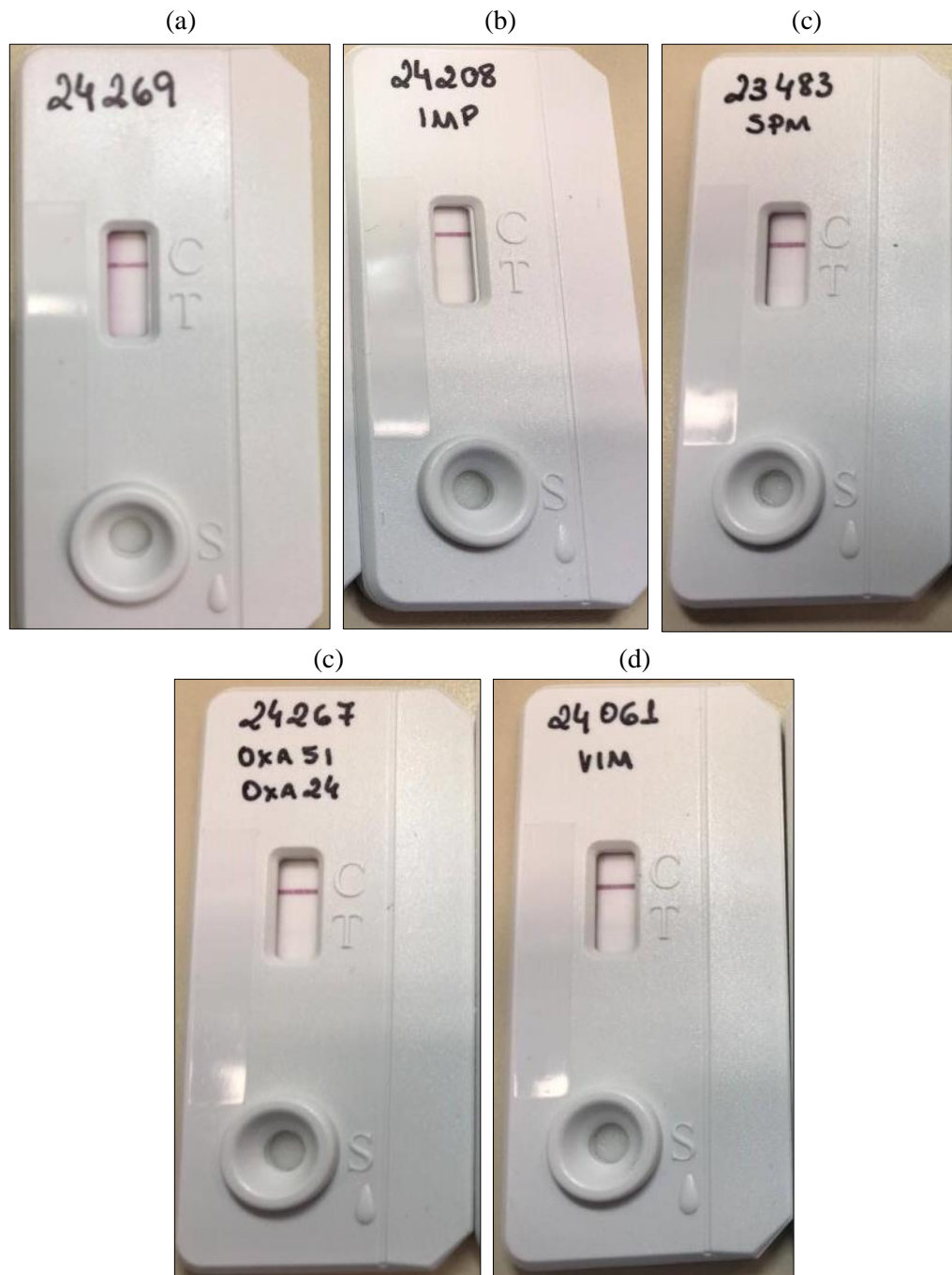


Figura 4.22: Avaliação do cruzamento 9.1 com colônias de (a) *K. pneumoniae* CCBH24269 produtora de KPC, (b) *P. aeruginosa* CCBH 24208 produtora de IMP, (c) *P. aeruginosa* CCBH 23483 produtora de SPM, (d) *A. baumannii* CCBH 24267 produtora de OXA-51-24 e (e) *P. aeruginosa* CCBH 24061 produtora de VIM diluídas em tampão Tris 500 mM (pH 8.0) + caseína 0.4% + Triton X-100 1% + NaCl 500 mM. Todas as amostras bacterianas avaliadas foram negativas.

Considerando que o anticorpo utilizado no desenvolvimento deste dispositivo imunocromatográfico foi do tipo policlonal, uma abordagem que poderia ser avaliada para

melhorar seu desempenho seria a utilização de anticorpos monoclonais como elemento de detecção, de forma que somente um epítopo da proteína seria ocupado, ficando os demais sítios livres para serem reconhecidos por outro anticorpo monoclonal ou policlonal na membrana de nitrocelulose. O uso de anticorpos policlonais como elemento de captura teria como grande vantagem o aumento da sensibilidade, pela possibilidade de detectar diferentes epítopos e pela facilidade para capturar o conjugado que está migrando, visto que possuem maior afinidade por seus epítopos (O'Farrel, 2013). O uso do policlonal como anticorpo de captura já foi empregado com sucesso para a detecção de OXA-23 em *A. baumannii* por imunocromatografia (Ji et al. 2016), neste estudo o pesquisador verificou que o uso do monoclonal conjugado e o policlonal impregnado na membrana aumentavam significativamente a sensibilidade do teste em relação ao uso de dois monoclonais. Portanto, essa abordagem será empregada no teste imunocromatográfico padronizado neste estudo para promover o aumento da sensibilidade, além do fato do uso do monoclonal ser primordial para o aumento da especificidade.

A avaliação do potencial da IgG anti-rNDM por ELISA forneceu resultados melhores que àqueles provenientes do teste imunocromatográfico, tendo sido capaz de detectar de forma mais sensível amostras produtoras de NDM. O melhor desempenho do anticorpo anti-rNDM na plataforma de ELISA pode ser atribuída: a sua maior sensibilidade visto que o sinal gerado pelo reconhecimento antígeno-anticorpo é amplificado pela ação enzimática da peroxidase; aos procedimentos de lavagem que dificultavam a permanência da ligação fraca entre antígenos não alvos ao anticorpo, além de retirarem o excesso dos elementos da reação, favorecendo o estabelecimento de um equilíbrio do sistema; aos períodos de incubação de amostra ou anticorpo, que favoreciam a ligação entre os elementos; e a capacidade do ELISA de suportar uma maior quantidade de amostra.

Apesar de o ELISA ter apresentado alta sensibilidade e especificidade para detecção de NDM em bactérias produtoras da enzima do que o teste imunocromatográfico desenvolvido, o mesmo não seria uma técnica atrativa para uso em laboratórios de países em desenvolvimento, visto que frequentemente não dispõem de recursos para aquisição de métodos mais custosos. A técnica de ELISA exige equipamentos como leitora de placas e máquinas de lavagem, maior quantidade de reagentes, pessoal mais qualificado para execução do método e tem processamento mais laborioso e lento. Mesmo o uso de um ELISA automatizado não seria uma opção melhor haja vista ser um equipamento oneroso e possivelmente não disponível em laboratórios de países em desenvolvimento. Portanto, o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico capaz de detectar NDM se destaca neste contexto, por ser uma ferramenta mais acessível, simples e rápida, que não exige equipamentos.

V. CONCLUSÃO

Neste estudo, anticorpos policlonais obtidos com a imunização de coelhos com NDM recombinante foram avaliados por ELISA e na plataforma imunocromatográfica. O anticorpo policlonal foi altamente específico e sensível na detecção de NDM em amostras produtoras e não produtoras de NDM por ELISA. O teste imunocromatográfico padronizado foi capaz de detectar rNDM com sucesso, inclusive em baixas concentrações da proteína. A avaliação do anticorpo policlonal na plataforma imunocromatográfica com amostras bacterianas mostrou sua capacidade de detectar a proteína nativa no lisado de diferentes bactérias produtoras de NDM com variação na intensidade da linha teste. O teste desenvolvido teve resultados negativos para amostras produtoras de outras carbapenemases. Os resultados obtidos com o dispositivo desenvolvido neste estudo mostraram que anticorpo policlonal anti-rNDM possui potencial para ser empregado na plataforma imunocromatográfica para diagnóstico de bactérias produtoras de NDM, principalmente em laboratórios de países em desenvolvimento que não dispõem de recursos para uso de técnicas mais onerosas. Estratégias como o uso de anticorpos monoclonais em associação ao policlonal e a avaliação de outras condições dos elementos do sistema podem ser empregadas para melhorar o funcionamento do teste.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham EP & Chain E. **An enzyme from bactéria able to destroy penicillin.** 1940. Rev. Infect. Dis. 1988; 10:677–8.
- Aires CA, Pereira PS, de Araujo CF, Chagas TP, Oliveira JC, Buonora SN, et al. **Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil.** Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(4). pii: e01048-16.
- Ambler RP. **The structure of β -lactamases.** Philos Trans Soc Lond B Biol Sci. 1980; 289:321–331.
- ANVISA. **ALERTA N° 01/2011.** [on line]. 2011. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [capturado 25 fev 2016]. Disponível em: <http://www.saude.mt.gov.br/upload/controle-infeccoes/pasta3/alerta-anvisa-01-ndm-nov-2011.pdf>.
- ANVISA. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde n° 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015.** [on line]. 2015. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [capturado 12 mai 2017]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074203/Boletim+de+Seguran%C3%A7a+do+Pacient+e+Qualidade+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde+n%C2%BA+14+Avalia%C3%A7%C3%A3o+dos+indicadores+nacionais+das+Infec%C3%A7%C3%B5es+Relacionadas+%C3%A0+Assist%C3%Aancia+%C3%A0+Sa%C3%BAde+%28IRAS%29+e+Resist%C3%Aancia+microbiana/dbd57c96-937f-45d3-93fd-e76684b7f35c>.
- Baneyx F, Mujacic M. **Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*.** Nat Biotechnol. 2004;22(11):1399-408.
- Bangs Laboratories, Inc. **Lateral Flow tests - Tech note 303** [on line]. 2013.[capturado 25 fev 2016]. Disponível em: <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=549e3a43d5a3f202388b4576&assetKey=AS%3A273658700861477%401442256727487>.
- Barrios H, Garza-Ramos U, Reyna-Flores F, et al. **Isolation of carbapenem- resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico.** J Antimicrob Chemother. 2013;68(8):1934–1936.
- Baroud M, Dandache I, Araj GF, Wakim R, Kanj S, Kanafani Z, et al. **Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases.** Int J Antimicrob Agents. 2013; 41:75–9.
- Baym M, Stone LK & Kishony R. **Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance.** Science. 2016; 351:40.
- Ben-David D, Kordevani R, Keller N, Tal I, Marzel A, Gal-Mor O, et al. **Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections.** Clin Microbiol Infect. 2012; 18:54–60.
- Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. **Spectrophotometry based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*.** Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 74:88–90.
- Biedenbach D, Bouchillon S, Hackel M, Hoban D, Kazmierczak K, Hawser S, et al. **Dissemination of NDM metallo-beta-lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* collected during the SMART global surveillance study from 2008 to 2012.** Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59:826–30.
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. **Molecular mechanisms of antibiotic resistance.** Nature. 2015; 13:42-51.

- Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. **Antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors.** Drug Res. Upd. 2014; 17:24-36.
- Bonnin RA, Naas T, Poirel L, Nordmann P. **Phenotypic, biochemical, and molecular techniques for detection of metallo- β -lactamase NDM in *Acinetobacter baumannii*.** J Clin Microbiol. 2012; 50(4):1419-21.
- Borah VV, Saikia KK, Chandra P, Hazarika NK, Chakravarty R. **New Delhi metallo- β -lactamase and extended spectrum β -lactamases co-producing isolates are high in community-acquired urinary infections in Assam as detected by a novel multiplex polymerase chain reaction assay.** Indian J Med Microbiol. 2016; 34(2):173-82.
- Boyle DP & Zembower TR. **Epidemiology and Management of Emerging Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria Extended-Spectrum β -Lactamases and Beyond.** Urol Clin N Am. 2015; 42:493–505.
- Burckhardt I, Zimmermann S. **Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours.** J Clin Microbiol. 2011; 49:3321–4.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. **A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.** Antimicrob. Agents Chemother. 1995; 39:1211–33.
- Bush K. **Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*.** Curr Opin Microbiol. 2010; 13:558–564.
- Bush K, Jacoby GA. **Updated functional classification of β -lactamases.** Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:969-76.
- Bush K, Fisher JF. **Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from Gram-negative bacteria.** Annu Rev Microbiol. 2011; 65:455–478.
- Butler SA, Khanlian SA and Cole LA. **Detection of early pregnancy forms of human chorionic gonadotropin by home pregnancy test devices.** Clin. Chem. 2011; 47:2131–2136.
- Carmo Junior NV, Filho HF, Gomes e Costa DA, Calvalcante AJ, Garcia D de O, Furtado JJ. **First report of a NDM-producing *Providencia rettgeri* strain in the state of São Paulo.** Braz J Infect Dis. 2015;19(6):675-6.
- Campana EH, Montezzi LF, Paschoal RP, Picão RC. **NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach.** Int J Antimicrob Agents. 2017; 49(1):119-121.
- Carvalho-Assef APD, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TPG, Timm LN, et al. **Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil.** J Antimicrob Chemother. 2013; 68:2956–7.
- Carvalho-Assef APD, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TPG, et al. **Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil.** Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58:2475–6.
- Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. **Early dissemination of NDM-1- and OXA-181- producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006–2007.** Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55:1274-8.
- CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States.** [on line]. 2013. Estados Unidos, Centers for Disease Control and Prevention <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twenty-third informational supplement. M100- S23. Wayne, PA: CLSI; 2013.

Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. **Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?** Lancet Infect Dis. 2011; 11:381-93.

Cunningham SA, Limbago B, Traczewski M, Anderson K, Hackel M, Hindler J, et al. **Multicenter Performance Assessment of the Carba NP Test**. J Clin Microbiol. 2017; pii: JCM.00244-17.

Dortet L, Brechard L, Poirel L, Nordmann P. **Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures**. Clin Microbiol Infect. 2013; 20:340-4.

Dortet L, Poirel L, Nordmann P. **Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria**. Biomed Res Int. 2014a; 2014:1–12.

Dortet L, Poirel L, Errera C, Nordmann P. **CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp.** J Clin Microbiol. 2014b; 52(7):2359-64.

Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. **The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean**. Expert Rev Anti Infect Ther. 2017;15(3):277-297.

Escobar Pérez JA, Olarte Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama Márquez IA, Garzón Aguilar MI, Martínez de la Barrera L, et al. **Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia**. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57: 1957–60.

Fair RJ & Tor Y. **Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century**. Perspect Medicin Chem. 2014; 6:25-64.

Faria-Junior C, Rodrigues LDO, Carvalho JOD, Franco OL, Pereira AL. **NDM-Producing *Enterobacteriaceae* Strains among Hospitals in Brasília, Brazil**. J Microbiol Exp. 2015;3(2): 00083.

Gamal D, Fernández-Martínez M, Salem D, El-Defrawy I, Montes LÁ, Ocampo-Sosa AA, et al. **Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt containing blaNDM-1 on IncR plasmids and its association with rmtF**. Int J Infect Dis. 2016; 43:17-20.

Girlich D, Poirel L, Nordmann P. **Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae***. J Clin Microbiol. 2012;50(2):477-9.

Gomes-Chagas TP, Carvalho-Assef APD, Caio AMA, Asensi MD. **Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil**. J Glob Antimicrob Resist. 2015; 3:147-8.

González LJ, Bahr G, Nakashige GT, Nolan EM, Bonomo RA, Vila AJ. **Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase**. Nature Chem Bio. 2016; 12:516-28.

Göttig S, Hamprecht AG, Christ S, Kempf VA, Wichelhaus TA. **Detection of NDM-7 in Germany, a new variant of the New Delhi metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity**. J Antimicrob Chemother. 2013; 68:1737-40.

Halaby T, Reuland AE, Al Naiemi N, Potron A, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. **A case of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands**. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56:2790–1.

Hawkey PM. **Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization.** *J Hosp Infect.* 2015; 89:241-7.

Hornsey M, Phee L, Wareham DW. **A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:5952-4.

Huang X, Aguilar ZP, Xu H, Lai W, Xiong Y. **Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: a review.** *Biosens Bioelectron.* 2016; 75:166-80.

Jacoby GA, Munoz-Price LS. **The new beta-lactamases.** *N Engl J Med.* 2005; 352:380-91.

Janelle SJ, Kallen A, de Man T, Limbago B, Walters M, Halpin A, et al. **Notes from the Field: New Delhi Metallo- β -Lactamase-Producing Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Identified in Patients Without Known Health Care Risk Factors - Colorado, 2014-2016.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(49):1414-1415.

Ji GY, Song HG, Son BR, Hong SB, Kim JW, Shin KS. **Development of a Novel Immunochromatographic Assay for Rapid Detection of VanA Ligase-Producing Vancomycin-Resistant Enterococci.** *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014; 24(3): 427-430.

Ji GY, Song HG, Jo MY, Hong SB, Shin KS. **Development of a Novel Immunochromatographic Assay for Rapid Detection of OXA-23 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii*.** *Biomed Sci Lett.* 2016; 22(2): 29-36.

Johnson AP, Woodford N. **Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance.** *J Med Microbiol.* 2013; 62:499-513.

Kaase M, Nordmann P, Wichelhaus TA, Gatermann SG, Bonnin RA, Poirel L. **NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt.** *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66:1260-2.

Kamphee H, Chairprasert A, Prammananan T, Wiriyaichaiyorn N, Kanchanatavee A, Dharakul T. **Rapid molecular detection of multidrug-resistant tuberculosis by PCR-nucleic acid lateral flow immunoassay.** 2015. *PLoS One* 10, e013779.

Karakus C, Salih BA. **Comparison of the lateral flow immunoassays (LFIA) for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection.** *J Immunol Methods.* 2013; 396(1-2):8-14.

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. **Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data.** *Bioinformatics.* 2012; 28:1647-9.

Khong WX, Xia E, Marimuthu K, Xu W, Teo YY, Tan EL, et al. **Local transmission and global dissemination of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM): a whole genome analysis.** *BMC Genomics.* 2016; 17:452.

Kim Y, Tesar C, Mire J, Jedrzejczak R, Binkowski A, Babnigg G, et al. **Structure of Apo- and Monometalated Forms of NDM-1—A Highly Potent Carbapenem-Hydrolyzing Metallo- β -Lactamase.** *PLOS One.* 2011; 6(9): e24621.

Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Tanaka M, Narahara K, Saito N, et al. **Development of an immunochromatographic assay for the rapid detection of AAC(6')-Iae-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(7):1382-6.

- Kitao T, Miyoshi-Akiyama T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Kirikae T. **Development of an immunochromatographic assay for diagnosing the production of IMP-type metallo- β -lactamases that mediate carbapenem resistance in *Pseudomonas*.** J Microbiol Methods. 2011; 87:330–7.
- Koczula KM, Gallotta A. **Lateral flow immunoassays.** Essays in Biochemistry. 2016; 60:111–120.
- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. **Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study.** Lancet Infect Dis. 2010; 10:597–602.
- Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. **Antibiotic resistance—the need for global solutions.** Lancet Infect Dis. 2013; 13:1057–98.
- Laxminarayan R. **Antibiotic effectiveness: Balancing conservation against innovation.** Science. 2014; 345:1299–1301.
- Lee AS, Huttner B, Harbarth S. **Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Infect Dis Clin North Am. 2011; 25:155–79.
- Levasseur P, Girard A-M, Miossec C, Pace J, Coleman K. **In vitro antibacterial activity of the ceftazidime-avibactam combination against *Enterobacteriaceae*, including strains with well-characterized β -lactamases.** Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59:1931–1934.
- Livermore DM, Woodford N. **The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*.** Trends Microbiol. 2006; 14: 413–420.
- Livermore DM. **Fourteen years in resistance.** Int J Antimicrob. 2012; 39: 283-94.
- Llarrull LI, Tioni MF, Kowalski J, Bennett B, Vila AJ. **Evidence for a dinuclear active site in the metallo-beta-lactamase BcII with substoichiometric Co(II). A new model for metal uptake.** J Biol Chem. 2007; 282:30586–95.
- MacVane SH. **Antimicrobial Resistance in the Intensive Care Unit: A Focus on Gram-Negative Bacterial Infections.** J Intensive Care Med. 2016; 1-13.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. **Microbiologia de Brock.** 12nd. ed. Artmed: São Paulo; 2010.
- Mamipour M, Yousefi M, Hasanzadeh M. **An overview on molecular chaperones enhancing solubility of expressed recombinant proteins with correct folding.** Int J Biol Macromol. 2017; 102:367-375.
- Martin A, Bombeck D, Mulders W, Fissette K, De Rijk P, Palomino JC. **Evaluation of the TB Ag MPT64 Rapid test for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex.** Int J Tuberc Lung Dis. 2011; 15:703-5.
- Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg GV, Hombach M. **Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with *Enterobacteriaceae* and development of a practical diagnostic algorithm.** J Clin Microbiol. 2015; 53:95–104.
- Mizuno Y, Yamaguchi T, Matsumoto T. **A first case of New Delhi metallo-beta-lactamase-7 in an *Escherichia coli* ST648 isolate in Japan.** J Infect Chemother. 2014; 20:814–816.
- Murphy K, Travers P, Walport M. **Janeway's immunobiology.** 7th ed. New York: Garland Science; 2008.
- Mushtaq S, Woodford N, Potz N, Livermore DM. **Detection of CTX-M- 15 extended-spectrum β -lactamase in the United Kingdom.** J Antimicrob Chemother. 2003; 52:528–9.

Neuhoff V, Stamm R and Eibl H. **Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis.** *Electrophoresis* 1985; 6:427-48.

Ngom B, Guo Y, Wang X, Bi D. **Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review.** *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397(3):1113-35.

Nielsen K, Yu WL, Kelly L, Bermudez R, Renteria T, Dajer A. et al. **Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to *Anaplasma marginale*.** *J. Immunoassay Immunochem.* 2008; 29, 10–18.

Nordmann P, Poirel L. **Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes.** *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8:321–31.

Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. **The emerging NDM carbapenemases.** *Trends Microbiol.* 2011a; 19:588–95.

Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA, Walsh TR. **How to detect NDM-1 producers.** *J Clin Microbiol.* 2011b; 49:718-21.

Nordmann P, Poirel L, Dortet L. **Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.** *Emerg Infect Dis.* 2012a; 18: 1503–1507.

Nordmann P, Boulanger AE, Poirel L. **NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2012b; 56: 2184–6.

Norris AL, Serpersu EH. **Ligand promiscuity through the eyes of the aminoglycoside N3 acetyltransferase IIa.** *Protein Sci.* 2013; 22:916–28.

O'Farrel B. **Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays.** In: Wild D. **The Immunoassay Handbook.** 4th. ed. New York; 2013. p.89-107.

OMS. **OMS Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance.** [on line]. 2001. Geneva, World Health Organization. [capturado 19 fev 2016]. Disponível em: http://www.OMS.int/drugresistance/OMS_Global_Strategy_English.pdf.

OMS. **The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action.** [on line]. 2012. Geneva, World Health Organization. [capturado 23 fev 2016]. Disponível em: http://apps.OMS.int/iris/bitstream/10665/44812/1/9789241503181_eng.pdf.

OMS. **Antimicrobial resistance global report on surveillance.** [on line]. 2014. Geneva, World Health Organization. [capturado 23 fev 2016]. Disponível em: http://apps.OMS.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf.

OMS, FAO, OIE. **Antimicrobial Resistance - A manual for developing national action plans.** Versão 1. [on line]. 2016. Geneva, World Health Organization. [capturado 12 mai 2017]. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204470/1/9789241549530_eng.pdf?ua=1.

Ong DCT, Koh TH, Syahidah N, Krishnan P, Tan TY. **Rapid detection of the *bla*NDM-1 gene by real-time PCR.** *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66:1647-9.

OPAS/OMS. **Epidemiological Alert: Nosocomial Transmission of NDM-Type Multiresistant Bacteria.** [on line]. 2012. The Pan American Health Organization/World Health Organization. [capturado 25 fev 2016]. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19622&Itemid=

- Oshiro S, Tada T, Kameoka Y, Suzuki K, Ohmagari N, Miyoshi-Akiyama T, et al. **Development and evaluation of immunochromatography to detect Gram-negative bacteria producing Arma 16S rRNA methylase responsible for aminoglycoside resistance.** J Microbiol Methods. 2015; 118:159-63.
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LHF, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, et al. **ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility.** Genet. Mol. Res. 2008; 7:861-871.
- Pagano M, Poirel L, Martins AF, Rozales FP, Zavascki AP, Barth AL, et al. **Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil.** Int J Antimicrob Agents. 2015; 19:1–2.
- Pasteran F, Meo A, Gomez S, et al. **Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina.** J Glob Antimicrob Resist. 2014; 2(4):344–345
- Pasteran F, Albornoz E, Faccone D, et al. **Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala.** J Antimicrob Chemother. 2012; 67(7):1795–1797.
- Pasteran F, Gonzalez LJ, Albornoz E, Bahr G, Vila AJ, Corso A. **Triton Hodge test: improved protocol for modified Hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers.** J Clin Microbiol. 2016; 54:640–649.
- Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. **Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies.** Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29:1099–106.
- Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. **Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection.** Clin Microbiol Newsl. 2009;31:55-62.
- Paterson DL, Bonomo RA. **Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.** Clin Microbiol Rev. 2005; 18:657-86.
- Paterson DL. **Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*.** Am J Infect Control. 2006; 34:S20–S28.
- Paul D, Bhattacharjee A, Bhattacharjee D, Dhar D, Maurya AP, Chakravarty A. **Transcriptional analysis of *bla*_{NDM-1} and copy number alteration under carbapenem stress.** Antimicrob Resist Infect Control. 2017; 6:26.
- Peng F, Wang Z, Zhang S, Wu R, Hu S, Li Z, Wang X, Bi D. **Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of H9 subtype avian influenza viruses.** Clin Vaccine Immunol. 2008; 15(3):569-74.
- Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. **Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340).** J Antimicrob Chemother. 2013; 68(2):312-6.
- Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TPG, Carvalho-Assef APD, et al. **First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil.** Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58:7592–4.
- Pires J, Novais A, Peixe L. **Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures.** J Clin Microbiol. 2013; 51(12): 4281–4283.

Pitout JD, Laupland KB. **Extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern.** Lancet Infect Dis. 2008; 8:159–66.

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. **Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences.** Future Microbiol. 2007; 2:501–512.

Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P. **Emergence of metallo-beta-lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* in Australia.** Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 4914–4916.

Poirel L, Nordmann P. **Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers.** J Clin Microbiol. 2015; 53: 3003–8.

Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. **Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey.** Anal Bioanal Chem. 2009; 393:569-82.

Qian S, Bau HH. **A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays.** Anal Biochem. 2003; 322(1):89-98.

Queenan AM, Bush K. **Carbapenemases: the versatile beta-lactamases.** Clin Microbiol Rev. 2007; 20:440–58.

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, et al. **Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates.** Braz J Med Biol Res. 2015; 48:174-7.

Rafei R, Dabboussi F, Hamze M, Eveillard M, Lemarié C, Mallat H, et al. **First report of blaNDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war.** Int J Infect Dis. 2014; 21:21–3.

Rajerison M, Dartevelle S, Ralafiarisoa LA, Bitam I, Dinh TNT, Andrianaivoarimanana V, et al. **Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of *Yersinia pestis* antibodies in humans and reservoirs.** PLoS Negl Trop Dis. 2009; 3:e421.

Ribeiro PPF. **TR DPP® HIV-1/2 – Bio-Manguinhos / TR DPP® Sífilis.** [on line]. s.d. [capturado 19 fev 2016]. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/page/2012/50770/apresentacao_5_screen_e_sifilis_final_treinamento_12684.pdf.

Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, et al. **Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil.** Int J Infect Dis. 2014; 25:79–81.

Sajid M, Kawde AN, Daud M. **Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review.** J Saudi Chem Soc. 2015; 19:689–705.

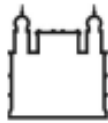
Sampaio JLM & Gales AC. **Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins.** Braz Jour Micro. 2016; 47:31–37.

Sullivan KV, Turner NN, McGowan KL. **Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) using the KeyPath MRSA/MSSA blood culture test and the BacT/ALERT system in a pediatric population.** Arch Pathol Lab Med. 2013; 15:1–3.

Tsuchido T & Takano M. **Sensitization by heat treatment of *Escherichia coli* K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds.** Antimicrob Agents Chemother. 1988; 32:1680–1683.

- van der Mee-Marquet N, Diene SM, Chopin F, Goudeau A, François P. **Enigmatic occurrence of NDM-7 enzyme in the community.** *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 47(6):505-7.
- Wailan AM, Paterson DL, Kennedy K, Ingram PR, Bursle E, Sidjabat HE. **Genomic Characteristics of NDM-Producing *Enterobacteriaceae* Isolates in Australia and Their blaNDM Genetic Contexts.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 60(1):136-41.
- Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A. **Evaluation of a new Etest for detecting metallo- β -lactamases in routine clinical testing.** *J Clin Microbiol.* 2002; 40:2755–9.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. **Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm?** *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18:306–25.
- Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. **Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study.** *Lancet Infect Dis.* 2011; 11:355-62.
- Waterman PE, McGann P, Snesrud E, Clifford RJ, Kwak YI, Munoz-Urbizo IP, et al. **Bacterial peritonitis due to *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 with plasmid-borne New Delhi metallo- β -lactamase in Honduras.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(9):4584–4586.
- Wilson J, Guy R, Elgohari S, Sheridan E, Davies J, Lamagni T, et al. **Trends in sources of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteraemia: data from the national mandatory surveillance of MRSA bacteraemia in England, 2006.** *J Hosp Infect.* 2011; 79:211–7.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. **Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:5046–5054.
- Yoshizumi A, Ishii Y, Livermore DM, Woodford N, Kimura S, Saga T, et al. **Efficacies of calcium-EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by *Escherichia coli* with NDM-1 β -lactamase.** *J Infect Chemother.* 2013; 19:992-5.
- Zmarlicka MT, Nailor MD, Nicolau DP. **Impact of the New Delhi metallo-beta-lactamase on beta-lactam antibiotics.** *Infect Drug Resist.* 2015;8:297-309.

ANEXO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

LICENÇA

LW-16/16

Certificamos que o protocolo (P-35/15-2), intitulado "Obtenção de soro policlonal anti-betalactamases NDM em soro de coelhos para desenvolvimento de imunodiagnóstico", sob a responsabilidade de JOSE PROCOPIO MORENO SENNA, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 16/05/2020 e inclui o uso total de :

Oryctolagus cuniculus
- 60 Machos de Nova Zelândia, Peso: 2,0000.

Rio de Janeiro, 16 de maio de 2016

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA