

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



Dissertação de Mestrado

**UTILIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (*LAMP*)
NA DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ENTEROBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES**

Róger Giusti Miller

Róger Giusti Miller

**UTILIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (*LAMP*)
NA DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ENTEROBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher.

Co-orientação: Profa. Dra. Janice Luehring Giongo

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M647u Miller, Róger Giusti

Utilização da amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) na detecção de genes de resistência em enterobactérias produtoras de carbapenemases / Róger Giusti Miller ; Rodrigo Vaucher, orientador ; Janice Giongo, coorientadora. — Pelotas, 2023.

71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Amplificação isotérmica mediada por loop. 2. Genes de resistência. 3. Enterobacteriaceae. 4. Carbapenemase.
I. Vaucher, Rodrigo, orient. II. Giongo, Janice, coorient. III. Título.

CDD : 616.0145

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Róger Giusti Miller

**UTILIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP)
NA DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ENTEROBACTÉRIAS
PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 14/04/2023

Banca examinadora:

Rodrigo de Almeida Vaucher

.....
Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher (Orientador)
Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Clovis Moreira Junior

.....
Prof. Dr. Clovis Moreira Junior
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

~~*Claudio Martin Pereira de Pereira*~~
.....
Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar saúde, força e coragem para enfrentar todos os momentos difíceis e por todas as graças recebidas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Vaucher, pela oportunidade e, principalmente, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao grupo LaPeBBioM, em especial ao colega Vitor Klein.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Hospital Escola UFPel-Ebserh, pela oportunidade.

Às minhas colegas de trabalho Camila de David Tessele Martini, Nara Oliveira Moura, Marta Pinho da Rosa e as demais que me apoiaram em todos os momentos.

A minha esposa e filhos, pelo apoio, compreensão e incentivo para que eu não desistisse dos meus sonhos.

A todas as demais pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

Resumo

MILLER, Róger Giusti. **Utilização da Amplificação Isotérmica Mediada por Loop (LAMP) na detecção de genes de resistência em Enterobactérias produtoras de Carbapenemases.** 2023. 75f. Dissertação (Mestrado Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. 2023.

Vários métodos têm sido propostos para identificar genes de resistência em bactérias multirresistentes. O mais utilizado para detectar a resistência adquirida é a amplificação do DNA alvo por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Em laboratórios pequenos, a aquisição desse equipamento é cara, muitas vezes inviabilizando a implementação do método. Assim, métodos alternativos de genotipagem têm sido propostos, com destaque para a amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP), que apresenta baixo custo operacional e boa especificidade e sensibilidade para a detecção alternativa de genes de resistência bacteriana. O presente estudo teve como objetivo estabelecer o uso de LAMP para detectar o gene blaKPC através da produção de beta-lactamase do tipo carbapenemase. Setenta e seis amostras de Enterobacteriaceae isoladas de amostras clínicas de pacientes do Hospital Escola UFPel-Ebserh foram isoladas, identificadas fenotipicamente e separadas de acordo com seu perfil de resistência. O marcador de resistência detectado com maior frequência foi a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), 51,32% (39/76), seguido pela coprodução de ESBL e carbapenemases, 35,53% (27/76), e carbapenemases isoladamente, 11,84 % (9/76). Encontramos apenas um caso de coprodução de KPC+MBL, 1,31% (1/76). As 76 amostras foram analisadas por qPCR para os genes blaKPC e blaNDM-1, obtendo 47,36% (36/76) de positividade para o gene blaKPC e 18,42% (14/76) para o gene blaNDM-1. Das 36 amostras que testaram positivo para o gene blaKPC, 25 concordaram com o teste fenotípico e foram usadas para otimizar os ensaios LAMP. No ensaio LAMP, verificamos a taxa de concordância substancial de LAMP com qPCR, com o valor do índice Kappa igual a 0,761. A sensibilidade foi avaliada a partir das mesmas diluições usadas em qPCR. O resultado da sensibilidade mostrou que o LAMP detectou 1,5 UFC mL⁻¹, dez vezes mais sensível que o qPCR. Nossos achados indicam que o ensaio LAMP pode ser utilizado no setor de bacteriologia e confirma as carbapenemases em rotinas e estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: Amplificação Isotérmica Mediada por Loop; genes de resistência; Enterobacteriaceae; carbapenemases.

Abstract

MILLER, Róger Giusti. **Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) in the detection of resistance genes in Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.** 2023. 75f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. 2023.

Various methods have been proposed for identifying resistance genes in multiresistant bacteria. The most used for detecting acquired resistance is amplifying the target DNA through polymerase chain reaction (PCR). In small laboratories, acquiring this equipment is expensive, often making implementing the method unfeasible. Therefore, alternative methods for genotyping have been proposed, more notably the loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which presents both a low operational cost and a good specificity and sensitivity for the alternative detection of bacterial resistance genes. The present study aimed to establish LAMP usage to detect the *blaKPC* gene by producing carbapenemase-type beta-lactamase. Seventy-six samples of Enterobacteriaceae isolated from clinical samples of patients of the Hospital Escola UFPel-Ebserh were isolated, phenotypically identified, and separated according to their resistance profile. The most frequent resistance marker detected was extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) production, 51.32% (39/76), followed by the co-production of ESBL and carbapenemases, 35.53% (27/76), and carbapenemases alone, 11.84% (9/76). We found only one case of co-production of KPC+MBL, 1.31% (1/76). The 76 samples were analyzed by qPCR for the *blaKPC* and *blaNDM-1* genes, obtaining 47.36% (36/76) positivity for the *blaKPC* gene and 18.42% (14/76) for the *blaNDM-1* gene. Of the 36 samples that tested positive for the *blaKPC* gene, 25 agreed with the phenotypic test and were used to optimize the LAMP assays. In the LAMP assay, we verified the substantial concordance rate of LAMP with qPCR, with the *Kappa* index value equal to 0.761. Sensitivity was evaluated from the same dilutions used in qPCR. The sensitivity result showed that LAMP could detect 1.5 CFU mL⁻¹, ten times more sensitive than qPCR. Our findings indicate that the LAMP assay can be used in the bacteriology sector and confirm carbapenemases in routines and epidemiological studies.

Keywords: Loop-Mediated Isothermal Amplification; resistance genes; Enterobacteriaceae; carbapenemases.