

R6. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE METALO- β -LACTAMASE DO TIPO NDM PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO.

Isadora Rodrigues da Silva¹; Thiago Pavoni Gomes Chagas²; Edimilson Domingos da Silva³; Ana Paula Carvalho-Assef²; Marise Dutra Asensi²; José Procópio Moreno Senna⁴; Cláudio Marcos Rocha².

¹ Lab. de Tecnologia Recombinante (LATER) - Biomanguinhos / Fiocruz e Lab. de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH) - Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

² Lab. de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH) - Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

³ Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) - Biomanguinhos / Fiocruz;

⁴ Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) - Biomanguinhos / Fiocruz.

INTRODUÇÃO A disseminação de bactérias multirresistentes é considerada uma séria ameaça à saúde da população. Segundo a Organização Mundial da Saúde, investimentos em pesquisa devem ser realizados em busca de maior acurácia e rapidez na identificação de patógenos multirresistentes e dos genes de resistência. Com o aumento alarmante do número de casos de infecções por patógenos produtores de Nova Déli metalo- β -lactamase (NDM) em diferentes países e a expansão da disseminação do gene para diversas espécies bacterianas, a detecção NDM se torna fundamental para o controle de infecção hospitalar, com o objetivo de prevenir a disseminação desse tipo de resistência e orientar a terapia antimicrobiana. O teste imunocromatográfico é uma técnica que se destaca em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico bacteriano, devido à sua rapidez para geração de resultados (10 a 30 minutos) e portabilidade, além de não exigir uma equipe qualificada ou equipamentos para interpretação dos resultados. Outras vantagens são a alta sensibilidade e a especificidade semelhantes aos testes de ELISA de terceira geração e com o custo mais baixo. Testes de imunocromatografia têm sido utilizados com sucesso na detecção de diferentes patógenos, como *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, o desenvolvimento de um teste rápido cromatográfico se justifica por ir de encontro aos interesses públicos.

OBJETIVO O objetivo deste projeto é a clonagem e a expressão do gene bla_{NDM} para futura construção e avaliação de um conjugado microesfera-anticorpos anti-NDM na plataforma imunocromatográfica, para a detecção de NDM em amostras bacterianas associadas a casos de infecção hospitalar.

METODOLOGIA O DNA genômico de uma amostra clínica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de NDM foi extraído e o gene bla_{NDM} foi amplificado por PCR. O produto da PCR foi utilizado como molde para construção do vetor pET28a+bla_{NDM}. Em seguida, a construção foi inserida por eletroporação em uma *Escherichia coli* TOP10. Os clones recombinantes obtidos foram avaliados quanto à presença do gene por PCR, digestão do plasmídeo purificado e por se quenciamento para detecção da integridade do inserto.

RESULTADOS A análise da PCR demonstrou a presença do gene bla_{NDM} em diferentes clones recombinantes. Além disso, a digestão do plasmídeo purificado confirmou o resultado anterior gerando uma banda de aproximadamente 730 pb compatível com o tamanho do gene clonado. Adicionalmente, o sequenciamento demonstrou que o gene não apresentava mutações e que estava em código de leitura correto.

CONCLUSÃO Estudos de indução da expressão e de solubilidade da proteína NDM recombinante em *E. coli* BL21 Star estão em andamento visando futura produção de anticorpos anti-NDM.

PALAVRAS-CHAVE NDM, teste imunocromatográfico.