



69806 - Padronização de PCR em tempo real para detecção e identificação do gene *MecA* Área de Conhecimento: Área da Saúde

Introdução: Atualmente, os casos com isolamento de *Staphylococcus* spp. resistentes vêm aumentando, tornando-se um problema em ambiente hospitalar, principalmente quando apresenta alta resistência à meticilina, em virtude da modificação de enzima alvo, codificada pelo gene *mecA*. Esse gene é responsável pela modificação na produção da enzima de ligação à penicilina, na qual confere a baixa afinidade pelos antibióticos como a meticilina e outros beta-lactâmicos, inibindo a ação desses medicamentos na célula-alvo. Para que se tenha um tratamento adequado, é fundamental a escolha de uma terapia antimicrobiana correta e eficaz, contudo é necessário que o diagnóstico seja feito de modo rápido e preciso. Em vista disso, a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real visa detectar e identificar esses microrganismos resistentes em poucas horas, de modo bastante sensível e específico. **Objetivo:** Padronizar uma técnica *in house* de uma PCR em tempo real para bactérias portadoras do gene *mecA*. **Métodos:** Para realizar a padronização, utilizou-se a cepa ATCC® (*American Type Culture Collection*) de *Staphylococcus aureus* (33591™), na qual foi incubada em caldo *Brain Heart Infusion* a 37°C por 24 horas e posteriormente semeada em ágar Mueller Hinton e incubada novamente a 37°C por 24 horas. Em seguida, realizou-se a extração do DNA microbiano, através de método de Lise Alcalina, conforme Millar e colaboradores (2000), com algumas modificações tais como a lavagem única com Tris-HCl e o aumento do número de rotação por minuto em todas as etapas da centrifugação. Após a extração, as amostras ainda foram quantificadas por fluorescência utilizando o equipamento *Qubit® 2.0 Fluorometer*. A técnica de PCR em tempo real foi realizada através do método por *Sybr® Green*, utilizando *primers* específicos (*Fw*-GTGAAGATATACCAAGTGATT e *Rv*-TGCGCTATAGATTGAAAGGAT). A solução mix foi realizada com as seguintes concentrações: 12,5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega®), 0,2 µL de cada primer e 2 µL do DNA extraído (10-15 ng/µL) e água destilada livre de DNase e RNase para um volume final de 20 µL. As condições da PCR em tempo real foram: 50°C durante 2 minutos e 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos e 60°C durante 60 segundos; e um passo de curva de fusão (a partir de 68°C a 95°C, aumentando gradualmente 0,5°C/segundo). **Resultados:** A partir do *software* do equipamento *DNA Technology®*, foi possível verificar uma *Tm* (Temperatura de *melting*) de 77,55°C para o gene *mecA*. **Considerações finais:** Foi possível padronizar uma PCR em tempo real *in house* para detecção do gene *mecA* em amostras bacterianas. Apesar da técnica padronizada apresentar custo elevado quando comparada com metodologias microbiológicas convencionais, é promissora devido à alta sensibilidade, especificidade e rapidez na identificação de bactérias resistentes.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, Genes de Resistência, Resistência a meticilina, PCR em tempo real

Autor - Betina Brixner

Coautor - Nayanna Dias Bierhals

Coautor - Vanessa Caroline Hermes

Coautor - Karoline Schroder da Silva

Coautor - Jane Dagmar Pollo Renner