

**UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA E FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

Carolina Marques Corrêa

**PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR EM TEMPO REAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS**

Santa Cruz do Sul
2018

Carolina Marques Corrêa

**PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR EM TEMPO REAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE
BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS**

Projeto de pesquisa a ser apresentado à disciplina de Trabalho de Curso II, do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jane Dagmar Pollo Renner
Coorientadora: Betina Brixner

Santa Cruz do Sul
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Sérgio e Élide e ao meu irmão Augusto, por todo incentivo e apoio incondicional que me foram dados. Vocês me fortaleceram em todas as etapas da minha graduação e isso contribuiu para que hoje eu pudesse estar onde estou. São os meus heróis.

Ao meu namorado Juan, por todo companheirismo, carinho, paciência, dedicação, amor e suporte. Ele é minha inspiração para alcançar dias melhores.

Às minhas orientadoras Jane Renner e Betina Brixner, por me permitirem fazer parte deste projeto e por todo auxílio e atenção que me foram dadas. Minha eterna admiração.

A todos os meus professores da graduação por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

A todos que fazem parte do CPTBio por toda ajuda que me foi dada, em especial a Nayanna, por toda dedicação para que meu projeto pudesse sair do papel.

Aos meus queridos amigos e colegas Silvio, Helena e Martina. Vocês contribuíram para que essa jornada fosse mais divertida e prazerosa. Sem palavras a vocês.

Por fim, agradeço aos demais amigos e familiares que foram essenciais por todo meu percurso, seja ele da graduação ou da vida.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”.

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: Infecções relacionadas à assistência à saúde acometem pacientes internados, principalmente, em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), expostos a uma gama de microrganismos patogênicos, o que favorece a seleção natural e, conseqüentemente, a colonização e/ou infecção por agentes multirresistentes. A utilização da PCR em tempo real para o diagnóstico de infecções bacterianas aumenta significativamente a sensibilidade da detecção e possibilita resultados em menor tempo, facilitando o início da terapia antimicrobiana, proporcionando à técnica uma maior vantagem frente a outros métodos já existentes na rotina laboratorial. Objetivo: Padronizar uma PCR em tempo real para identificação de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Métodos: A padronização da técnica de PCR em tempo real foi realizada com cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) clinicamente importantes em casos de IRAS, incluindo *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). A realização da extração de DNA bacteriano foi executada conforme adaptação da técnica de lavagem/lise alcalina. Para a reação de PCR Universal TaqMan 16S rDNA bacteriano utilizou-se os *primers* NT-341Fw e 16S-522Rv e *probes* para Gram positivos e Gram negativos que tiveram suas sequências desenhadas no GenBank. Resultados: A reação de qPCR Uniplex apresentou uma média de 25,28 para os Ct das amostras em duplicata da bactéria Gram positiva e de 25,21 para as amostras em duplicata das bactérias Gram negativas, enquanto que na qPCR Multiplex obteve-se uma média de Ct de 23,9 para a bactéria *S. aureus* (Gram positiva) e Ct de 27,15 para as bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* (Gram negativas).

Palavras-chave: Infecção Hospitalar, Bactérias Gram positivas, Bactérias Gram negativas, PCR em tempo real.

ABSTRACT

Introduction: Infections related to health care affect patients hospitalized, mainly in Intensive Care Units (ICU), exposed to a range of pathogenic microorganisms, which promotes the natural selection and, consequently, colonization and/or infection by multiresistant agents. The use of real time PCR for the diagnosis of bacterial infections significantly increases the sensitivity of detection and allows results in a shorter time, facilitating the start of antimicrobial therapy, giving the technique a greater advantage over other methods already existing in the laboratory routine. **Objective:** Standardize real time PCR for identification of Gram positive and Gram negative bacteria. **Methods:** Standardization of a real time PCR technique was determined with standard strains of the American Type Culture Collection (ATCC) clinically important in cases of HAIs, including *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). The bacterial DNA extraction was performed according to the adaptation of the alkaline wash/lysis technique. For the Universal TaqMan 16S rDNA bacterial PCR reaction, the primers NT-341Fw and 16S-522Rv and probes for Gram positive and Gram negative were used which had their sequences drawn in GenBank. **Results:** The uniplex qPCR reaction presented an average of 25,28 for the Ct of duplicate samples of the Gram positive bacteria and 25,21 for the duplicate samples of the Gram negative bacteria, while in the Multiplex qPCR, an average of Ct 23,9 for *S. aureus* (Gram positive) and Ct of 27,15 for the bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa* (Gram negative).

Keywords: Cross Infection, Gram positive bacteria, Gram negative bacteria, real time PCR.