

## **OTR.09 - Desenvolvimento de ensaio baseado em qPCR para determinação de carga bacteriana em órgãos infectados por MRSA (methicilin resistant *Staphylococcus aureus*)**

Felipe Betoni Saraiva<sup>1\*</sup>; Cristiane Pinheiro Pestana<sup>1</sup>; Leandro Barrio Napoleão<sup>1</sup>; José Procópio Moreno Senna<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Fiocruz/Bio-Manguinhos.

### **Introdução:**

MRSA é um patógeno envolvido em infecções nosocomiais, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade mundialmente. Infecções com MRSA são de difícil tratamento devido à multi-resistência a antibióticos, conferida pela presença do gene *mecA* codificante para a PBP2a - uma proteína que se liga à penicilina com baixa afinidade a  $\beta$ -lactâmicos. Nosso grupo vem desenvolvendo projetos com biofármacos, para o tratamento desta comorbidade. Estes projetos utilizam ensaios de proteção em modelos animais que é avaliada através de metodologia padrão de cultura celular, a qual é demorada e laboriosa. Técnicas moleculares para detectar o *mecA* são consideradas padrão-ouro no diagnóstico do MRSA e estudos demonstram que a metodologia de qPCR é mais específica, sensível, reprodutível e segura quando comparada ao cultivo celular.

### **Objetivo:**

O objetivo deste estudo é desenvolver um ensaio de qPCR para quantificar MRSA em órgãos infectados.

### **Metodologia:**

As amostras de baço e rins utilizados neste estudo são provenientes de ensaios de infecção com MRSA em modelo murino. Para a construção das curvas padrão, MRSA foi pré-cultivado em meio LB/ampicilina a partir de uma colônia. Em seguida, 100  $\mu$ L foram cultivados em 40 mL até a fase exponencial. As bactérias foram centrifugadas e ressuspensas 3 vezes, sendo na última em 10% do volume. Após retirada de alíquota para quantificação (semeadura em placa), foram armazenadas à -80°C. Diluições seriadas de base 10 de MRSA foram adicionadas a 20 mg de homogenato de órgãos não infectados.

Para a obtenção do DNA utilizou-se um kit comercial seguindo protocolo do

fabricante (Promega). Para amplificar uma região do gene *mecA* por TaqMan qPCR, oligonucleotídeos específicos foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0. As reações foram conduzidas em triplicata no Sistema SteppOne em ciclagem padrão. A eficiência da reação foi calculada usando o *slope* das curvas padrões. Amostras positivas e negativas foram testadas para verificar a especificidade. Os resultados da quantificação nos tecidos por cultivo em placa e qPCR foram comparados.

### **Resultado:**

Desenvolvemos com sucesso um método de TaqMan qPCR para quantificação de carga bacteriana em ensaios com MRSA. Este foi capaz de detectar de  $2,52 \times 10^5$  à  $10^9$  e  $4,19 \times 10^5$  à  $10^9$  bactérias viáveis e não-viáveis nos tecidos, baço e rins, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,99 e eficiência acima de 95%. Em comparação a técnica convencional de 3 diluições diferentes ( $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ ) detectou de  $1 \times 10^2$  à  $3 \times 10^6$  bactérias viáveis.

### **Conclusão:**

O método de quantificação baseado em TaqMan qPCR mostrou-se ser mais preciso, sensível, seguro e eficaz que o método convencional. A qPCR permitiu a realização de várias análises, mesmo após o congelamento do material, diferentemente do plaqueamento, que deve ser realizado imediatamente após a homogeneização dos órgãos. Portanto, a qPCR apresenta significativas vantagens para sua implementação.

**Palavras-chave:** MRSA; *mecA*; qPCR