

PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE METALO-BETALACTAMASES

Com o grande número de terapia utilizando antibióticos β -lactâmicos, classe antimicrobiana mais empregada em tratamentos infecciosos, tem-se um crescente surgimento de bactérias Gram negativas produzindo novas enzimas resistentes. Dentre os genes mais comumente descritos em bactérias Gram negativas produtoras de metalo-beta-lactamase (MBL) cita-se o *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{NDM-1}, os quais conferem importante resistência aos antibióticos disponíveis no mercado e aumentando os índices de morbimortalidade. O objetivo desse trabalho foi padronizar uma técnica *in house* de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real para os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{NDM-1}. Para a padronização do método foram utilizadas cepas ATCC[®] (*American Type Culture Collection*) de *Escherichia coli* (BAA 2452TM e ATCC 14621TM) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853TM) as quais foram semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas. Em sequência, o DNA microbiano foi submetido a extração por lavagem alcalina, adaptando a técnica descrita por Millar e colaboradores (2000), realizando somente uma lavagem com Tris-HCl e aumentando o número de rotação por minuto em todas as etapas da centrifugação. Após, foi realizada a PCR em tempo real pelo método de Sybr[®]Green, seguindo o protocolo descrito por Quiles e colaboradores (2015) com *primers* específicos para cada gene testado. 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). Após realizada a PCR em tempo real no equipamento DNA Technology[®], foi possível verificar as T_m (Temperatura de melting) obtida para cada gene testado. Para o *bla*_{IMP} a T_m foi de 77,6°C, para o *bla*_{VIM} foi de 87,4°C, para o *bla*_{SPM-1} foi de 81,6°C e para o *bla*_{NDM-1} de 91,5°C. Foi possível padronizar a técnica de PCR em tempo real para os genes de MBL *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SPM-1} e *bla*_{NDM-1}. Este método é uma ferramenta importante para a identificação de genes que conferem resistência as bactérias, bem como fazer diagnóstico mais rápido, quando comparado às técnicas microbiológicas convencionais.

Palavras-chave: Resistência Microbiana a Medicamentos, PCR em tempo