

## **R18 - DESENVOLVIMENTO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BACIOS GRAM-NEGATIVOS PRODUTORES DAS CARBAPENEMASES MAIS PREVALENTES NO BRASIL**

Daniele Rocha<sup>1</sup>, Elisabete de Andrade<sup>1</sup>, Marcela Fontana<sup>1</sup>, Marise Asensi<sup>2</sup> e Thiago Chagas<sup>2</sup> Antonio G. P. Ferreira<sup>1</sup>, Patricia Alvarez<sup>1</sup>

1 Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

2 IOC/FIOCRUZ

**Objetivo:** A incidência de SEPSE tem aumentado ao longo das últimas décadas e, juntamente com suas sequelas, é a principal causa de morbimortalidade em UTIs gerais. No Brasil, estima-se que ocorram, pelo menos, 200 casos de sepse/ano, com mortalidade de 50%. O objetivo do presente trabalho é desenvolver um kit de diagnóstico molecular laboratorial, com base na plataforma tecnológica de PCR em tempo real, para detecção dos genes das principais carbapenemases existentes no Brasil (KPC, NDM, OXA-48, SPM-1, OXA-23, OXA-51).

**Metodologia:** O ensaio de PCR em tempo real foi padronizado com bactérias sonicadas, consideradas controle positivo (estabelecida na PCR convencional), e bactérias submetidas à lise térmica. Para lise térmica bacteriana foram utilizadas duas condições: a) previamente aquecidas 95°C/5' e b) colocadas diretamente na reação de PCR, obtendo-se a lise durante a ativação enzimática, (TAQ *hot start*) 95°C/10'. O controle interno utilizado foi o gene constitutivo 16SrRNA. Foram testadas duas ciclagens de PCR: Protocolo Bio-Manguinhos e Protocolo CDC. Para os experimentos foram utilizadas cepas KPC+, NDM+ e KPC-/NDM-, e realizados ensaios de PCR em Tempo Real realizados em “single” e em multiplex.

**Resultados:** Para os ensaios em “single” observou-se amplificação satisfatória para KPC+, NDM+ e 16SrRNA independente da lise térmica (prévia ou não) e/ou sonicção. O PCR multiplex obteve resultados muito satisfatórios, quando comparados com os resultados em “single” de cada cepa e em comparação com as amostras sonicadas. Não houve diferença de amplificação entre as duas ciclagens testadas.

**Conclusão:** Das condições avaliadas todas obtiveram êxito, sendo a coleta direta da placa de petri e a ciclagem adaptada do CDC, o modo mais simples e rápido para realização do teste. Pode-se concluir que a prova de conceito foi alcançada, por intermédio dos resultados preliminares obtidos que são altamente satisfatórios, podendo futuramente ser incorporado na rotina de testes para identificação e detecção de cepas bacterianas isoladas de pacientes com quadro clínico de SEPSE.