

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

## **PADRONIZAÇÃO DE MÉTODO IN HOUSE PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS DIRETAMENTE DE AMOSTRAS DE URINA<sup>1</sup>**

**Katianne Wolf Krawczak<sup>2</sup>, Bruno Vizzotto<sup>3</sup>, Bruna Schultz Bandeira<sup>4</sup>, Luciana Mendes Machado<sup>5</sup>, Marister Regina Fioreze<sup>6</sup>.**

<sup>1</sup> Projeto de pesquisa desenvolvido para avaliação da disciplina de Técnicas de Biologia Molecular do curso de graduação em Biomedicina do Centro Universitário Franciscano.

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Graduação em Biomedicina da UNIFRA. Monitora da disciplina de Histologia do curso de Medicina da UNIFRA. Email: katianne\_94@hotmail.com

<sup>3</sup> Professor Orientador. Farmacêutico. Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Paraná - UFPR (Curitiba-PR) e Doutorando em Patologia pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA (Porto Alegre-RS). Email: bvizzotto@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Acadêmica do Curso de Graduação em Biomedicina da UNIFRA. Email: bruna\_schultz@outlook.com

<sup>5</sup> Acadêmica do Curso de Graduação em Biomedicina da UNIFRA. Email: lu87mendes@hotmail.com

<sup>6</sup> Acadêmica do Curso de Graduação em Biomedicina da UNIFRA. Email: maristerfioreze@gmail.com

### Introdução

O *Staphylococcus aureus* é considerado um dos grandes causadores de várias doenças associadas às infecções de pele, mucosa e ainda do trato urinário, em razão disso, este trabalho tem o intuito de padronizar uma técnica para a extração de DNA dessa bactéria. A partir disso busca-se uma adaptação de protocolos com métodos in house, utilizando amostras de urina, para melhor detecção do DNA durante a extração dessa bactéria que se classifica como gram-positiva. Considerando as dificuldades dessa padronização como tais os inibidores de reação que podem ser produtos da urina ou até mesmo algum fator do protocolo. Com a padronização dum protocolo para extração dessa bactéria especificamente em amostras de urina facilita o melhor diagnóstico de doenças causadas através dessa bactéria.

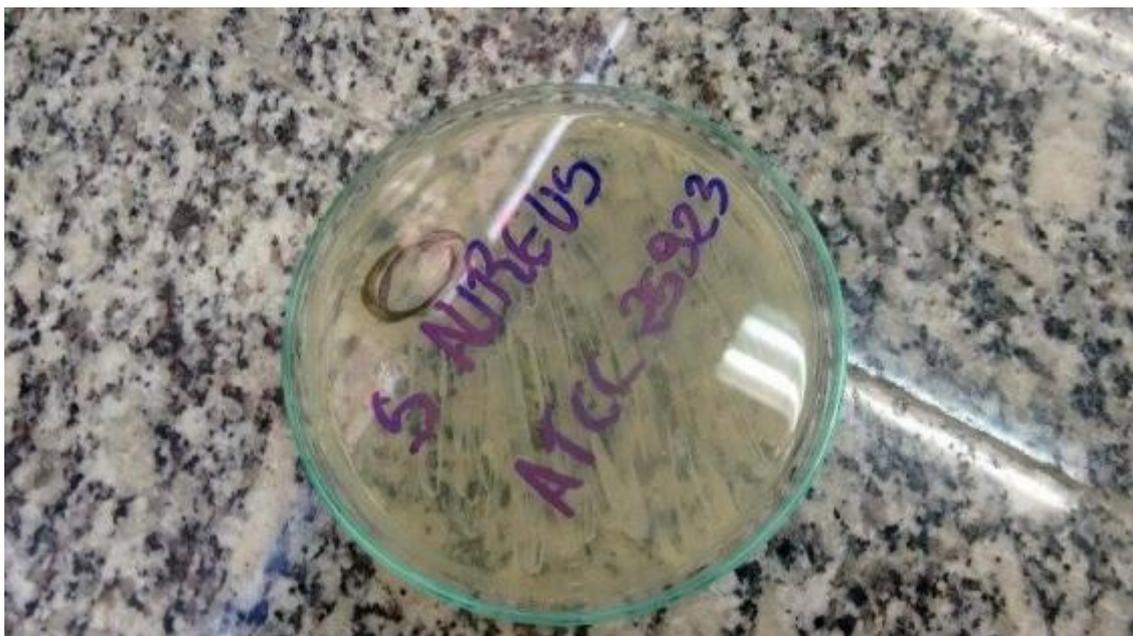
### Metodologia

Para detectar *Staphylococcus aureus* será padronizado um método de extração de DNA in house diretamente de amostras de urina, onde serão seguidas várias etapas até a obtenção de um DNA purificado e livre de inibidores para PCR, sem a utilização de etapas de cultura bacteriana.

As amostras de urina a serem analisadas serão contaminadas em diferentes concentrações de acordo com a escala McFarland. Serão utilizadas as concentrações de 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>1</sup> unidades formadoras de colônias (UFC)/mL para conhecer o intervalo de detecção por PCR convencional do DNA de *Staphylococcus aureus* neste protocolo. A PCR convencional será revelada por eletroforese em gel de agarose.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

O protocolo de extração de DNA para esta bactéria consiste em centrifugar 1 mL de urina em um eppendorf a 10.000xg por 10 minutos, descartar o sobrenadante por inversão, lavar com tampão fosfato salino, adicionar 1 mL do tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 8, 100mM EDTA pH 8, 1,5M de NaCl, 40µg/mL de proteinase K), misturar por inversão durante 10 minutos, adicionar 100µL de SDS 20%, incubar a 65°C por 1 hora, centrifugar a 6.000xg por 10 minutos, transferir o sobrenadante para um novo eppendorf contendo metade do volume de polietileno glicol 30% e cloreto de sódio 1,6M, incubar a temperatura ambiente por 2 horas, centrifugar a 10.000xg por 20 minutos, ressuspender o pellet em 200µL de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA sódico pH 8), adicionar acetato de potássio (7,5M) para uma concentração final de 0,5M, transferir as amostras para o gelo por 5 minutos, centrifugar a 16.000xg por 30 minutos a 4°C, extrair a fase aquosa com fenol/clorofórmio e clorofórmio/álcool isoamílico, precipitar o DNA com a adição de 0,6 volume de isopropanol, incubar por 2 horas em temperatura ambiente, centrifugar a 16.000xg por 30 minutos, ressuspender com tampão TE e armazenar as amostras a -20°C.



Placa da bactéria cultivada Staphylococcus aureus.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica



Contaminação da urina com a bactéria *Staphylococcus aureus*.

## Resultados e Discussões

O *Staphylococcus aureus* ou *Estafilococos aureus*, em português, é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram positivos, pertencente a família *Staphylococcaceae*,

é uma das bactérias mais comuns na prática clínica uma vez que costuma colonizar a pele de até 15% dos seres humanos. Chamamos de colonização quando uma bactéria se adere a uma tecido e começa a multiplicar-se, criando literalmente colônias. A colonização não significa que haja infecção e não é necessariamente uma coisa ruim. (PINHEIRO, 2013).

Esta bactéria, frequentemente encontrada na pele, boca, nariz, intestino, pode ser causadora de vários tipos de infecções, principalmente quando o sistema imunológico se encontrar fragilizado.

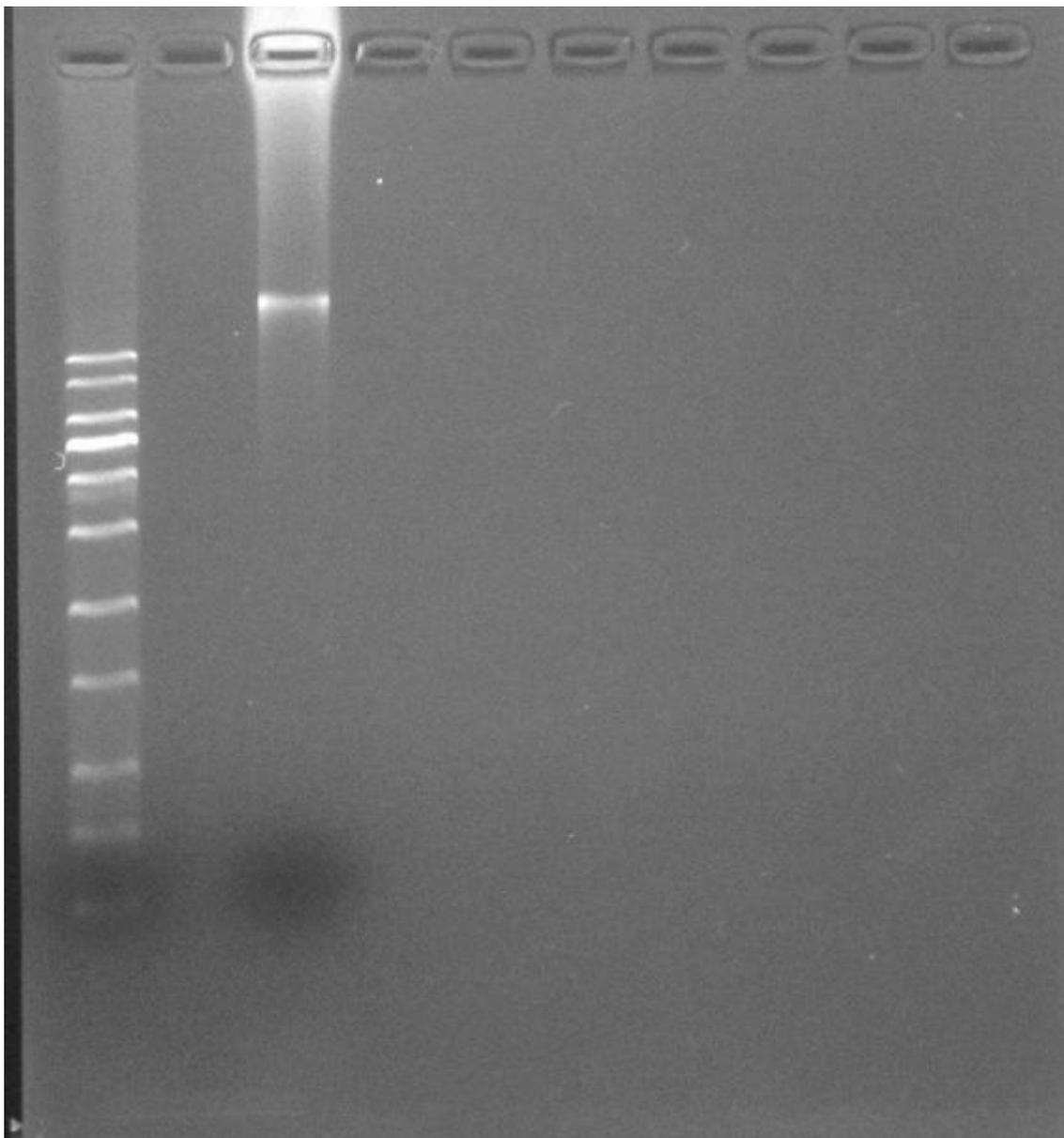
Existem 33 tipos de estafilococos, alguns mais virulentos que outros. O tipo mais comum na nossa pele é o *Staphylococcus epidermiditis*, uma espécie de estafilococo bem mais branda que o *Staphylococcus aureus*, o mais virulento da espécie. (PINHEIRO, 2013)

Este projeto de pesquisa tem como objetivo padronizar uma técnica para extração de DNA, in house, do *Staphylococcus aureus* utilizando amostras de urinas.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

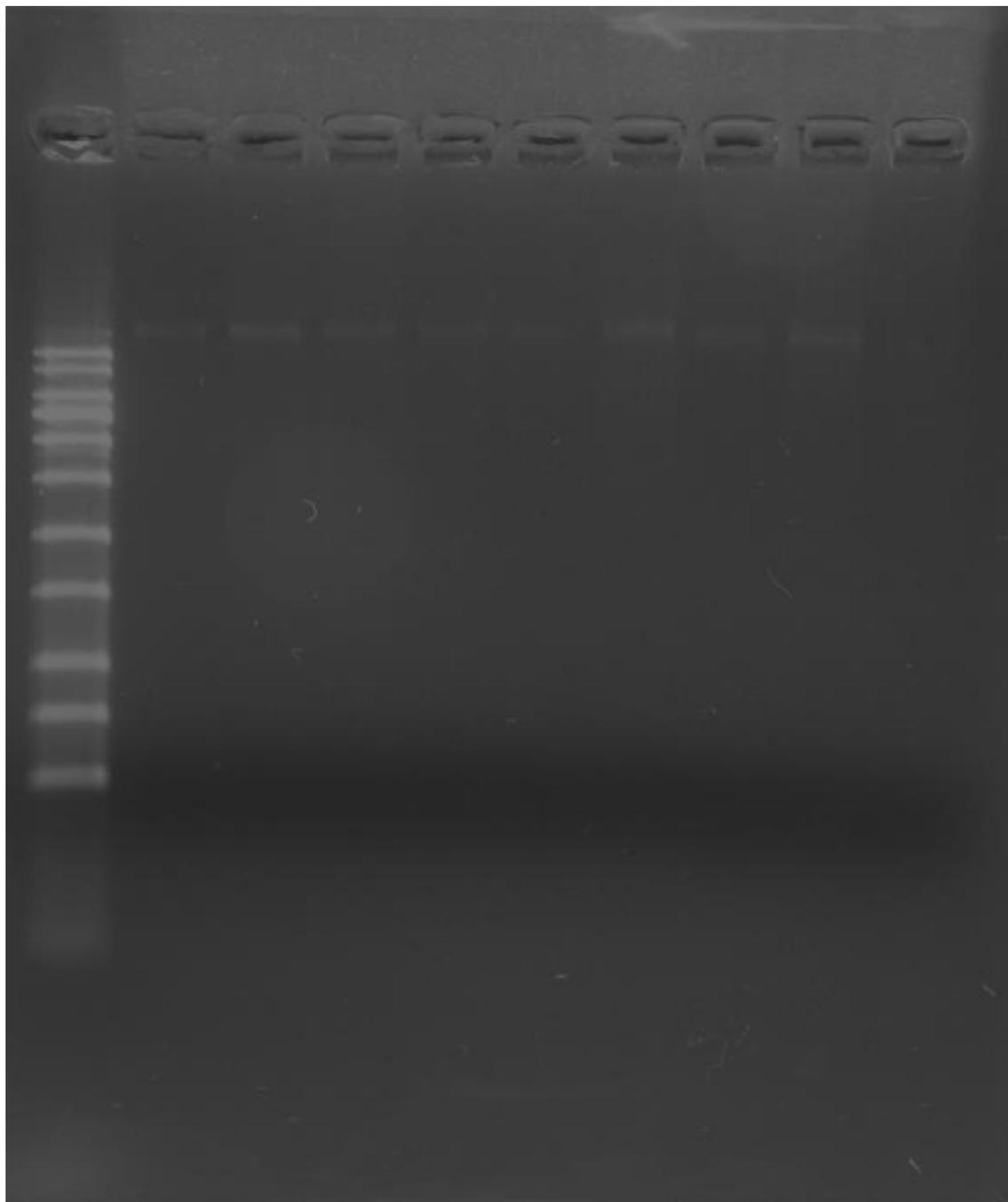
Até o momento foi possível se obter um controle positivo para essa extração a partir de bactérias cultivadas em placas e extraídas com a utilização de Kits de extração da marca Invitrogen (PureLink Genomic DNA Mini Kit). Esse controle positivo é utilizado na PCR da extração feita com o método in house, sendo um marcador da banda que o DNA genômico dessa bactéria atinge no gel de agarose. E após foi realizada uma contaminação de urina, e diluição dessa urina na escala McFarland sendo utilizada as concentrações de  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Após esse passo é feito uma extração com o protocolo in house adaptado onde se obteve bons resultados, considerados positivos que foram revelados em uma Eletroforese com Gel de Agarose.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica



Eletroforese com gel de Agarose: PCR do nosso Controle Positivo

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica



Eletroforese com gel de agarose: Extração da urina com as amostras de 10<sup>o</sup> até 108

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

A temperatura de Melt utilizada para anelamento dos primers na PCR foi de 55 °C, obtidas a partir de um cálculo realizado em cima dos primers ( $4X (G + C) + 2X (A+T)$ ) e uma consulta no BLAST (plataforma de informações de primers) e os primers utilizados são esses: F-5' GCGATTGATGGTGATACGGTT 3' R- 5'AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC 3'.

A partir de uma extração de DNA de solos (YEATES et al., 1998), foram feitas modificações no protocolo de extração que possibilitaram a extração de DNA de amostras de várias origens, entre elas, a extração direta de DNA de amostras de urina com eficiência na detecção de bactérias gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* (CHAUDHURI, PATTANAYAK, THAKUR, 2006). McFarland é uma escala utilizada para determinar a concentração de bactérias em suspensão em uma solução, quanto maior a quantidade de bactérias, maior será a turvação. Um valor de 0,5 na escala McFarland corresponde a 108 unidades formadoras de colônias (UFC)/mL, para leituras feitas em absorbância utilizando espectrofotômetro, uma absorbância de 0,3 em um comprimento de onda de 600nm corresponde a 108 UFC/mL.

A padronização ainda continua em andamento, pois estamos procurando melhores resultados na PCR dessa extração, que já foi realizada, mas ainda estamos fazendo repetições para se conseguir um resultado mais definitivo e assim finalizar a padronização de extração de DNA do *Staphylococcus aureus* com amostras de urina e métodos in house.

#### Conclusões

Por conseguinte, temos que é de extrema importância a padronização de um método in house (em casa) da extração de DNA da bactéria *Staphylococcus Aureus* utilizando amostras de urina, pois assim facilitará a obtenção de diagnósticos de doenças causadas por essa bactéria, que vimos ao decorrer deste trabalho o quanto infecções causadas por *staphylococcus aureus* é comum no nosso cotidiano. Além disso, obter resultados positivos nesta padronização amplia a linha de pesquisas em torno dessa bactéria, podendo trazer muitos benefícios para a saúde da sociedade.

**Palavras-Chave:** Bactéria; DNA; Extração; Padronização; Método in house.

#### Referências

CASTRO, V. L. S. S. Validação de testes de biopesticidas em mamíferos: princípios e identificação de fatores componentes da incerteza. Disponível em: <[http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos\\_72.pdf](http://www.cnpma.embrapa.br/download/documentos_72.pdf)>. Acesso em 20 de maio, 2015.

CHAUDHURI, S. R.; PATTANAYAK, A. K.; THAKUR, A. R. Microbial DNA extraction from samples of varied origin. *Currents Science, India*, v. 91, p. 1697-1700, 2006.

KUEHNERT et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in the United States, 2001–2002. *The Journal of Infectious Diseases, Estados Unidos*, p. 172-179, 2006.

NICOLLE, L.; Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrobial Resistance and Infection Control, Canada*, p. 01-08, 2014.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIII Seminário de Iniciação Científica

ONANUGA, A.; AWHOWHO, G. O. Antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus strains from patients with urinary tract infections in Yenagoa, Nigeria. Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences, Nigeria, p. 1-10, 2012.

PINHEIRO, Pedro. STAPHYLOCOCCUS AUREUS | QUAIS OS RISCOS DESTA BACTÉRIA? Disponível em: <http://www.mdsaude.com/2009/02/estafilococos-aureus-mrsa.html>. <Acesso em 21 de jun. 2015>.

SUTTON, S. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. Journal of validation technology, 2011.

VASUDEVAN, R. Urinary Tract Infection: An Overview of the Infection and the Associated Risk Factors. Journal of Microbiology & Experimentation, India, v. 1, p. 1-15, 2014.

YEATES et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. Biological Procedures Online, Australia, v. 1, p. 40-47, 1998.