

Extração de dna genômico bacteriano: uma comparação de métodos comerciais e *in house*

Bacterial genomic dna extraction: a comparison of commercial and in house methods

Nayanna Dias Bierhals, Betina Brixner, Karoline Schroder da Silva,
Caio Fernando de Oliveira, Jane Dagmar Pollo Renner

Como citar este artigo:

BIERHALS, NAYANNA D.; BRIXNER, BETINA; SILVA, KAROLINE D.; OLIVEIRA, CAIO F.; RENNEN, JANE D. P.;
Extração de dna genômico bacteriano: uma comparação de métodos comerciais e *in house*.
Revista Saúde (Sta. Maria). 2020; 46 (2).

Autor correspondente:

Nome: Nayanna Dias Bierhals
E-mail: nayanna.db@outlook.com
Telefone: (51) 986394776
Formação Profissional: Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

Filiação Institucional: Universidade de Santa Cruz do Sul
Endereço para correspondência:
Avenida Euclides Kliemann
Bairro: Castelo Branco
Cidade: Santa Cruz do Sul
Estado: Rio Grande do Sul
CEP: 96835-422

Data de Submissão:
14/11/2019

Data de aceite:
21/10/2020

Conflito de Interesse: Não há conflito de interesse



RESUMO

Objetivo: Comparar e avaliar quatro diferentes métodos de extração de DNA bacteriano. **Métodos:** Foram utilizadas cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas para extração do DNA pelos seguintes métodos: fervura, lise alcalina, kit *in house* e kit comercial; de modo a comparar os resultados referentes as análises quantitativas e qualitativas, eficiência na PCR em tempo real, tempo, reprodutibilidade e custo. **Resultados:** Na análise quantitativa e qualitativa, pode-se observar que houve variações em relação aos resultados obtidos para cada amostra e para cada extração, no entanto, os métodos de fervura, lise alcalina e do kit *in house* apresentaram, em geral, purezas semelhantes. Já nos resultados obtidos pela PCR em tempo real todos os métodos se mostraram eficientes. Ainda, em relação ao tempo, reprodutibilidade e custo o método por fervura se destacou nos três comparativos. **Conclusão:** Pode-se perceber que o método de lise alcalina ganhou destaque em todos os comparativos avaliados, apresentando ampliações excelentes na PCR, boas quantidades de DNA, pureza satisfatória, tempo ideal e custo e reprodutibilidade consideráveis, tanto para bactérias Gram positivas como Gram negativas, sendo uma opção interessante para aplicação na rotina laboratorial.

PALAVRAS-CHAVE: DNA bacteriano; PCR em tempo real; Bactérias Gram-negativas; Bactérias Gram-positivas.

ABSTRACT

Objective: To compare and evaluate four different methods of bacterial DNA extraction. **Methods:** We use control strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria for DNA extraction by the following methods: boiling, alkaline lysis, in house kit and commercial kit. We compare the results of quantitative and qualitative analyses, real time PCR efficiency, time, reproducibility and cost. On quantitative and qualitative analyses we observe some variations in results obtained for each strain and method, however, boiling, alkaline lysis and in house kit showed similar purity. Real time PCR results confirmed the efficiency of all methods tested. **Results:** Regarding time, reproducibility and cost the boiling method stood out with good results. **Conclusion:** The alkaline lysis method achieved better performance presenting excellent PCR amplifications, good DNA amounts, satisfactory purity, ideal time and cost and reproducibility acceptable for both Gram-positive and Gram-negative bacteria, being a very interesting option for application on laboratory routine.

KEYWORDS: Bacterial DNA; Real time PCR; Gram-positive bacteria; Gram-negative bacteria.

INTRODUÇÃO

Bactérias são microrganismos unicelulares de origem procarionte que podem ser diferenciadas através de sua morfologia, características bioquímicas, fatores nutricionais e fontes de energias¹. Inúmeras bactérias fazem parte da microbiota normal humana, porém, em decorrência de imunossupressão, muitas delas podem se tornar patogênicas, causar infecções, gerando impactos sociais e financeiros, além de serem consideradas uma ameaça à saúde pública²⁻⁵. Atualmente, diversas metodologias estão sendo desenvolvidas com o intuito de ajudar na detecção desses microrganismos, uma vez que as técnicas microbiológicas convencionais apresentam um longo tempo de resposta e sensibilidade limitada⁶⁻⁸.

Com a finalidade de diminuir o tempo de diagnóstico e aumentar a sensibilidade e especificidade dos resultados, as técnicas moleculares estão sendo uma escolha interessante na rotina laboratorial para identificar doenças infecciosas^{6,9,10}. Para obter resultados satisfatórios nessas análises, a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano é um passo crucial, uma vez que a qualidade e quantidade do DNA extraído da amostra influenciam diretamente na reação. Também deve-se levar em consideração a composição da parede celular das bactérias, a qual pode influenciar na extração do material genético. Além disso, o DNA não pode conter quaisquer substâncias inibitórias do produto da análise molecular, do mesmo modo que não deve apresentar resultados falsos-negativos¹¹⁻¹³.

O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar quatro diferentes métodos de extração de DNA bacteriano, conforme os seguintes critérios: quantidade a qualidade do DNA obtido, desempenho na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, reprodutibilidade, tempo e custo.

MÉTODOS

Cultivo bacteriano

Para a realização dos quatro protocolos de extração do DNA bacteriano foram utilizadas cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) de bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). As cepas foram inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Em sequência, foram semeadas em ágar Muller-Hinton e novamente incubadas por 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Extração de DNA

Foram comparados diferentes métodos para extração de DNA de bactérias a fim de avaliar e comparar as metodologias em relação aos objetivos propostos. As técnicas foram realizadas em duplicata, utilizando 10 colônias bacterianas em cada extração, conforme descritas a seguir.

Fervura

Em microtubo contendo 500 µL de TE (Tris-EDTA) 1X adicionou-se as colônias bacterianas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm (rotações por minuto) durante 5 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 µL de TE 1X. As amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições. Repetiu-se o último processo. Posteriormente, o *pellet* formado foi ressuspensionado em 100 µL de TE 1X e incubou-se a 100°C durante 10 minutos. Por fim, foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos e submetidas a um banho de gelo durante mais 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C.

Lise Alcalina

A técnica por lise alcalina foi realizada com modificações¹⁴. Inicialmente, foram adicionadas as colônias bacterianas em microtubo contendo 500 µL de TE 1X. Em seguida acrescentou-se 1 mL da solução de Lise Alcalina (0,5 M NaOH e 0,05 M Na₃C₆H₅O₇), misturou-se no vórtex por alguns segundos e, posteriormente, em agitador por 10 minutos. Na sequência foram centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular em 500 µL de Tris-HCl (pH 8). Misturou-se as amostras em vórtex, por alguns segundos, e centrifugou-se a 14000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e adicionou-se 100 µL de Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM EDTA). Logo, as amostras foram incubadas a 100°C durante 1 hora. Após esse período, realizou-se o ciclo congela/descongela duas vezes, que consiste em um banho de gelo por 10 minutos e aquecimento em bloco de aquecimento a 100°C por 5 minutos. Por fim, foram centrifugadas a 14500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um novo microtubo e então armazenado a -20°C.

Kit *in house* (CPTBio DNA Extraction II)

Essa técnica foi realizada utilizando um kit *in house*, conforme protocolo elaborado pelo grupo de pesquisa. Em um microtubo contendo 500 µL de TE 1X, adicionou-se as colônias bacterianas e em seguida 500 µL de Lise Celular, homogeneizando em vórtex por alguns segundos. Posteriormente, as amostras foram incubadas por uma hora a 96°C e em seguida, adicionou-se 400 µL da solução de Clorofórmio-Fenol (1:1). Centrifugou-se a 8000 rpm durante 10 minutos. Após esse processo houve a formação de duas fases, sendo descartada somente a fase superior. Seguindo, foram adicionados 600 µL da Solução Purificadora I e então centrifugadas 10000 rpm por 5 minutos. Adicionou-se 600 µL da Solução Purificadora II, sendo centrifugadas nas mesmas condições anteriores. As amostras foram mantidas em aquecimento a 45°C durante duas horas. Na sequência, foram adicionados 50 µL da Solução de Reidratação, na qual foram novamente incubados a 35 ± 2°C, durante três horas. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo microtubo e armazenado a -20°C.

Kit comercial (Purelink® Genomic DNA)

Essa técnica foi realizada conforme os protocolos do fabricante, o qual varia conforme a classificação da bactéria, com modificações. Para bactérias Gram negativas, primeiramente adicionou-se as colônias em um microtubo já contendo 180 µL de *PureLink® Genomic Digestion Buffer*. Em seguida, acrescentou-se 80 µL de Proteinase K e misturou-se em vórtex por alguns segundos, seguindo para incubação a 55°C durante uma hora. Após esse período foram adicionados 20 µL de RNase, 200 µL de *PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer* e 200 µL de etanol absoluto, misturando-se em vórtex entre um reagente e outro. Já para bactérias Gram positivas, as amostras foram acrescidas em 200 µL do *Lysozyme Digestion Buffer* (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100 e 20 mg/mL de Lisozima) e após incubadas a 35 ± 2°C durante 30 minutos. Na sequência, foram adicionados 20 µL de Proteinase K e 200 µL de *PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer*, sendo estão novamente incubadas a 55°C por mais 30 minutos. Por fim, acrescentou-se 200 µL de etanol absoluto. A segunda parte da extração foi em comum para as bactérias Gram positivas e negativas, em que prosseguiu da seguinte maneira: todo o conteúdo da amostra foi transferido para um tubo contendo *spin* coluna, na qual foi centrifugado a 11000 rpm por 1 minuto e após, transferiu-se somente a coluna para um novo tubo, em que foram adicionados 500 µL de *Wash Buffer I* e foi centrifugado novamente nas mesmas condições. O processo foi repetido usando o *Wash Buffer II*. Por último, foram acrescentados 100 µL de *PureLink® Genomic Elution Buffer* seguido de centrifugação a 14500 rpm por 3 minutos. A coluna foi descartada e o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado a -20°C.

Análise quantitativa e qualitativa

O DNA obtido a partir das extrações foi quantificado tanto por espectrofotometria pelo NanoDrop® 2000c *Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, EUA), como por fluorescência utilizando o kit *High Sensitivity dsDNA* (Invitrogen, EUA) no Qubit® *Fluorometer 2.0* (Life Technologies, EUA). O NanoDrop® também foi empregado na análise de pureza das amostras. Ainda, as amostras foram analisadas quanto a sua integridade em um gel de agarose 1% com brometo de etídio e visualizado sob luz UV no transluminador L-Pix Image EX (Loccus Biotecnologia, BR).

Eficiência na PCR em tempo real

A fim de testar a eficiência do DNA extraído, as amostras foram amplificadas por PCR em tempo real através do sistema *TaqMan*, em que foram utilizados *primers* universais para identificação do gene 16s bacteriano, além de sondas específicas para cada Gram (Tabela 1)¹⁵. A reação foi composta nas seguintes concentrações: 10 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix II* (Applied Biosystems®), 0,25 µM de cada *primer*, sonda, 2 µL de amostra (padronizadas em

aproximadamente 1 ng/μL) e água estéril isenta de DNase/RNase, para um volume final de 20 μL. Para a identificação de bactérias Gram negativas, utilizou-se 0,15 μM da sonda VIC (Probe Gram negativa, tabela 1) e para as Gram positivas, utilizou-se 0,05 μM da sonda FAM (Probe Gram positiva, tabela 1). A amplificação foi realizada no equipamento *StepOnePlus* (Applied Biosystems®) nas seguintes condições: 50 °C durante 2 minutos e 95 °C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto.

Tabela 1: Primers e sondas utilizadas na PCR em tempo real

	Sequência (5' - 3')	Amplificação	Pares de base
Primers			
NT-341Fw	GACTCCTACGGGAGGC	rDNA	192
16S-522Rv	GCGGCTGCTGGCAC	rDNA	192
Sondas			
GP- <i>Probe</i>	FAM-CTGA(T/C)(G/C)(G/C)AGCAACGCCGCG- MGB	Gram Positivo	-
GN- <i>Probe</i>	VIC-CCTGA(T/C)(G/C)CAGC(A/C)ATGCCGCG – MGB	Gram Negativo	-

Avaliação do tempo, reprodutibilidade e custo

Por fim, as amostras ainda foram comparadas quanto ao tempo total em horas de extração, custo em reais dos reagentes empregados por amostra (valores calculados com base em abril de 2019) e reprodutibilidade do método – que consiste em avaliar quantas etapas cada protocolo apresenta, levando em consideração o grau de complexidade para a continuidade da extração.

RESULTADOS

Análise quantitativa e qualitativa

Na análise quantitativa pode-se observar que houve variações em relação aos resultados obtidos, conforme descrito na Tabela 2. A quantificação por fluorescência obteve média de 33,2 ng/μL para o método de fervura, 28,5 ng/μL para o kit comercial, 12,5 ng/μL para a lise alcalina e 12,4 ng/μL para o kit *in house*. Já nos resultados por espectrofotometria, o kit *in house* obteve média de 4.458,2 ng/μL, o método por fervura 876,9 ng/μL, a lise alcalina 138,9 ng/μL e o kit comercial 79,0 ng/μL.

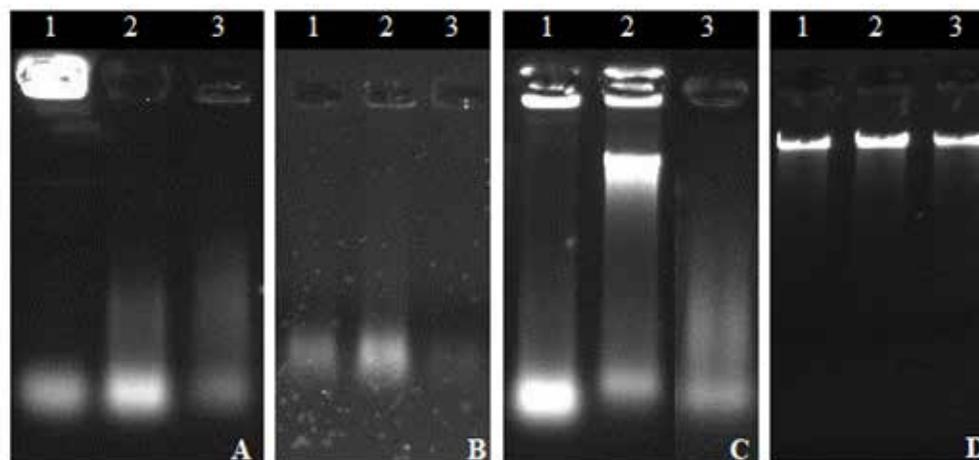
A análise qualitativa (Tabela 2) avaliou a relação 260/280nm para a verificação dos resultados quanto a pureza do DNA extraído, enquanto a relação 260/230 nm indicou a presença de inibidores de PCR presentes em cada amostra. Ainda, na Figura 1, tem-se a resolução em gel de agarose 1% dos DNAs bacterianos extraídos, em que o kit comercial foi o método que apresentou um DNA mais íntegro frente a todas as bactérias testadas.

Tabela 2: Comparação entre os quatro métodos de extração testados quanto a quantidade (ng/μL) e qualidade (absorbância) do material genético extraído.

Método Bactéria	Fervura			Lise Alcalina			Kit <i>in house</i>			Kit comercial		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Quantidade de DNA												
NanoDrop	697,7	724,0	1209,1	278,6	117,2	20,8	5387,8	3077,1	4909,7	14,3	43,9	178,9
Qubit	21,3	42,2	36,1	21,6	13,8	2,1	19,3	4,8	13,1	3,0	41,2	41,3
Pureza do DNA												
260/280 nm	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,9	1,8	1,7	1,8	1,7	1,9	1,9
Presença de Inibidores de PCR												
260/230 nm	1,4	1,2	1,4	0,8	0,9	0,6	1,8	1,9	1,8	0,5	1,3	1,8

Legenda: ¹ *Staphylococcus aureus*, ² *Escherichia coli*, ³ *Pseudomonas aeruginosa*

Figura 1: Análise das amostras de DNA extraídos em gel de agarose 1%.

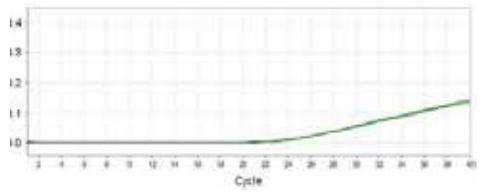
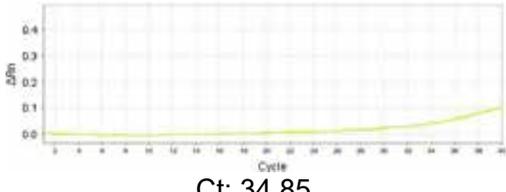
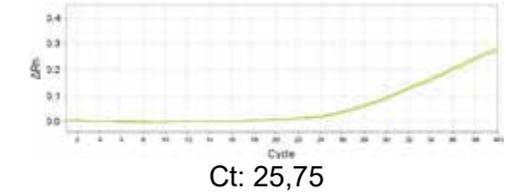
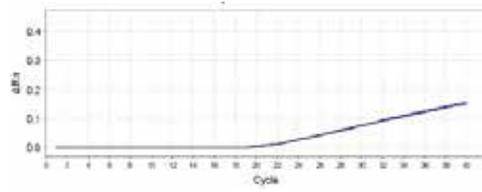
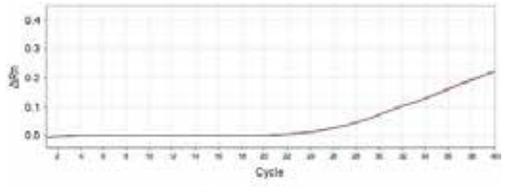
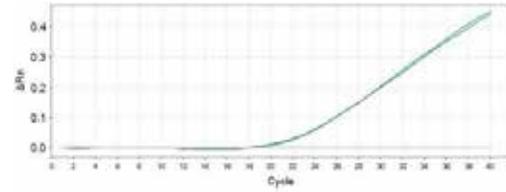
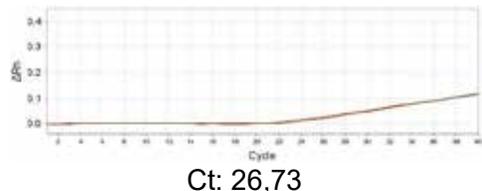
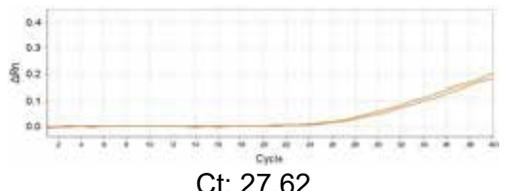
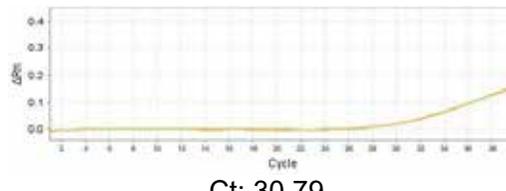
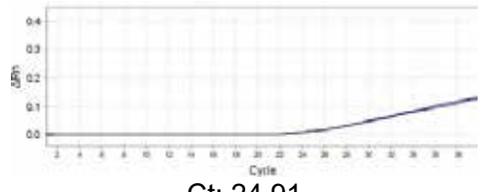
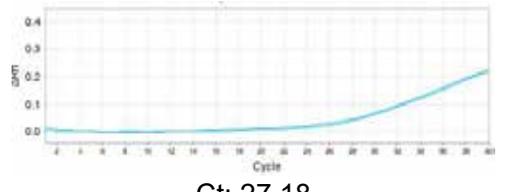
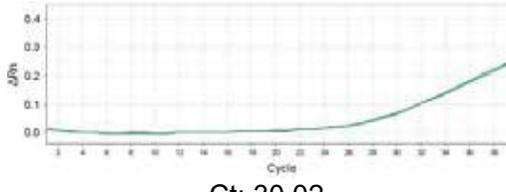


Legenda: ¹ *Staphylococcus aureus*, ² *Escherichia coli*, ³ *Pseudomonas aeruginosa*. A: Fervura, B: Lise alcalina, C: *Kit in house*, D: Kit comercial

Eficiência na PCR em tempo real

Através da reação de PCR em tempo real foi possível testar a eficiência dos DNAs extraídos, em que as amostras de todos métodos de extração testados apresentaram amplificação e valores de Ct (Cycle Threshold) variando de 21,9 a 34,8 (Quadro 1).

Quadro 1: Amplificação e valores de Ct de cada amostra e seu respectivo método de extração.

Método	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fervura	 Ct: 24,61	 Ct: 34,85	 Ct: 25,75
Lise Alcalina	 Ct: 21,90	 Ct: 26,20	 Ct: 22,98
Kit in house	 Ct: 26,73	 Ct: 27,62	 Ct: 30,79
Kit comercial	 Ct: 24,91	 Ct: 27,18	 Ct: 30,02

Avaliação do tempo, reprodutibilidade e custo

Os resultados referentes ao tempo, reprodutibilidade e custo dos métodos de extração estudados foram detalhados na Tabela 3.

Tabela 3: Comparação entre os quatro métodos de extração estudados quanto ao tempo, reprodutibilidade e custo de extração por amostra.

Método	Fervura	Lise Alcalina	Kit <i>in house</i>	Kit comercial
Tempo (horas)	1	2,2	7	2,8
Reprodutibilidade (etapas)	12	16	18	24
Custo por amostra (R\$)	0,004	0,06	0,09	13,58

DISCUSSÃO

Sabe-se que os métodos microbiológicos convencionais, considerados padrão-ouro, apresentam um tempo de resposta que pode levar de 48 a 72 horas, protelando assim o início da terapia antimicrobiana direcionada¹⁶. Estudos já mostram que os métodos moleculares, como a PCR em tempo real, vêm sendo utilizados com sucesso na detecção do DNA bacteriano em amostras clínicas, diminuindo o tempo de espera do diagnóstico e aumentando a sensibilidade e especificidade da resposta^{9,17,18}. Por isso, buscou-se selecionar um método de extração de DNA eficiente e de qualidade, de modo que o mesmo possa ser empregado no ensaio de PCR.

As amostras de todas as extrações avaliadas foram quantificadas e pode-se observar que os valores encontrados pelo NanoDrop[®] foram nitidamente maiores que aqueles encontrados no Qubit[®]. Isso justifica-se pelo fato que a absorbância lida no NanoDrop[®] não é específica para DNA e, com isso, acaba sendo afetada por contaminantes como ácido húmico, polissacarídeos e até mesmo fitas simples de DNA. Já o Qubit[®] utiliza corantes específicos que se ligam nas fitas duplas de DNA e conseqüentemente, não permite a leitura de outras substâncias¹⁹.

O método por fervura obteve boas quantificações por fluorescências (Qubit[®]) para todas as três bactérias testadas. Já a extração por lise alcalina não permitiu uma boa extração de *P. aeruginosa*, porém sabe-se que essa bactéria possui uma rígida cápsula de polissacarídeos mucóides, o que pode ter interferido no processo de extração, visto que essa estrutura é mais difícil de ser lisada, prejudicando o alcance do material genético^{1,20}. O kit *in house*, por sua vez, apresentou baixas quantificações para *E. coli*, o que pode ter ocorrido em virtude desta bactéria apresentar uma parede celular com uma camada mais fina de peptidoglicano e devido aos vários ciclos de aquecimento desse protocolo, resultando na degradação do DNA em alguma das etapas da extração¹. Já a extração pelo kit comercial se diferenciou por extrair uma menor quantidade da bactéria *Staphylococcus aureus*, o que pode ter sido ocasionado por algum erro

no preparo da solução *Lysozyme Digestion Buffer*, único reagente não contido no kit ou ainda devido a amostra ser Gram positiva e conseqüentemente, apresentar uma camada de peptidoglicano mais espessa, dificultando a lise completa da parede celular¹.

Na análise de pureza das amostras pode-se verificar no presente estudo que os métodos de fervura e lise alcalina mostraram absorvâncias satisfatórias na relação 260/280 nm para todas as bactérias estudadas, pois sabe-se que absorvâncias menores que 1,8 nesta relação indicam baixo teor de pureza e alto teor de proteínas, bem como valores acima de 2 podem sugerir presença de ácidos ribonucleico^{s21-22}. Já na relação 260/230 nm, nenhum método atingiu os valores adequados e esperados, sendo o kit *in house* o que apresentou resultados medianos e aproximados com o preconizado na literatura, em que valores menores que 2 pode ser um indicativo de presença de inibidores de PCR, como por exemplo, compostos orgânicos e sais^{21,23}.

Através da análise qualitativa, pode-se observar que todos os métodos, com exceção do kit comercial, apresentaram arraste em suas amostras, podendo ser ocasionado devido a presença de DNA concentrado e/ou concentrações de impurezas na amostra, como as proteínas²⁴. Além disso, a diferença na intensidade das bandas evidencia diferentes quantidades de material genético extraído²⁴. A técnica de eletroforese em gel de agarose adotada para análise dessa variável, é amplamente empregada nos laboratórios devido a sua fácil reprodutibilidade e baixo custo. Ainda, o presente estudo utilizou o brometo de etídio para coloração e visualização do DNA, no entanto, ele exige um maior cuidado na manipulação e infraestrutura apropriada, devido a sua ação mutagênica²⁵. Alternativas com menor toxicidade e conseqüentemente maior segurança, já estão disponíveis no mercado, como o Sybr[®] Green, Sybr[®] Gold, GelRed[®] e o laranja de tiazol, contudo alguns desses corantes ainda apresentam maior custo e podem não ser tão sensíveis quanto o brometo de etídio^{25,26}.

A eficiência dos métodos de extração foram testadas através dos resultados obtidos na PCR em tempo real. A partir dos valores de Ct encontrados neste estudo, é possível assegurar que a quantidade de DNA extraído em todas as técnicas foram satisfatórias, uma vez que através do Ct é possível avaliar a quantidade de DNA presente na reação. Sabe-se que essa relação é inversamente proporcional, ou seja, valores altos de Ct indicam baixa quantidade de material genético, bem como valores de Ct menores indicam maior quantidade de DNA²⁷. Ainda, a literatura indica que valores de Ct indeterminados ou >41 são considerados resultados negativos, assim como valores entre 35 e 40 que podem ser avaliados ainda como inconclusivos, o que não foi observado neste estudo, uma vez que o valor de Ct maior foi de 34,85 para *E. coli* extraída pelo método de fervura²⁷⁻³⁰.

A extração por fervura, apesar de ser a mais econômica e rápida, foi a que apresentou menor eficiência na PCR quando comparada com os outros métodos, uma vez que, apesar dos valores de Ct serem próximos as outras técnicas de extração de DNA, foi a que apresentou menor fluorescência. Já o kit *in house* e o kit comercial, obtiveram melhores

resultados nesse quesito, no entanto o número de passos do primeiro e o preço do segundo os tornam menos vantajoso. O método de lise alcalina, por sua vez, apresentou as melhores ampliações, além de possuir um tempo relativamente médio e um custo bastante baixo.

Quanto a avaliação dos custos, ainda que o valor do kit *in house* seja baixo, é o protocolo mais extenso devido aos longos e repetitivos períodos de incubação, e ainda apresenta uma etapa de separação de fases orgânicas, em que o *pellet* encontra-se no meio, entre as duas fases, com isso esses dois fatores acabam atrapalhando a reprodutibilidade do método, fazendo com que o mesmo não seja a principal escolha em uma rotina laboratorial, principalmente em lugares que a demanda será maior. O kit comercial, por sua vez, apresentou o maior número de etapas, sendo este ainda o mais complexo em virtude dos diferentes protocolos para bactérias Gram positivas e Gram negativas. Os métodos de fervura e lise alcalina assemelham-se no número de etapas e são igualmente reprodutíveis, pois os protocolos são de baixa complexidade e consistem em basicamente adicionar e remover os reagentes.

Todos os três primeiros protocolos se tratam de métodos *in house*, e por isso acabam tendo um menor custo que os métodos comerciais, em vista de que a maioria dos reagentes utilizados são facilmente encontrados em qualquer laboratório de biologia molecular, na qual são comprados em grande quantidade e por um preço ainda mais acessível, principalmente se levar em consideração que a quantidade utilizada por amostra é bem pequena. O método de extração pelo kit comercial ainda utiliza tubos com *spin* coluna, tornando-o mais oneroso que outros kits comerciais disponíveis no mercado. Outro fator que interfere no custo do kit comercial é o fato dele apresentar dois protocolos diferentes dependendo da classificação celular da bactéria, conseqüentemente na prática clínica, em que a amostra é desconhecida, cada amostra deverá ser extraída pelos dois protocolos, aumentando ainda mais o valor, sem contar que o grande número de etapas e manipulações pode aumentar a chance de contaminação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em vista das análises realizadas todos os métodos testados alcançaram seu maior objetivo que era a eficiência na PCR em tempo real. Contudo, a quantidade e qualidade do DNA, tempo, custo e reprodutibilidade de cada extração também são fatores cruciais na aplicação do método em uma rotina laboratorial. Com isso, pode-se dizer que o método de lise alcalina foi o que apresentou resultados satisfatórios em comparação com todas as variáveis analisadas, tanto para bactérias Gram positivas como Gram negativas, de forma que obteve boas ampliações na PCR, quantidades de DNA adequada, relações de pureza satisfatórias, tempo ideal e custo e reprodutibilidade aceitáveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências de fomento colaboradoras, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio de bolsas de estudo para desenvolvimento da pesquisa. Ainda, agradecem a Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) e ao Parque Científico e Tecnológico Regional da UNISC (TecnoUnisc) pela infraestrutura disponibilizada.

Apoio: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

1. Tortora GI, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 12^a Ed. Porto Alegre: Artmed; 2017.
2. Chin CS, Sorenson J, Harris JB, Robins WP, Charles RC, Jean-Charles RR, et al. The origin of the haitian cholera outbreak strain. *N Engl J Med*. 2011; 364(1): 33-42.
3. Garcia LM, César ICO, Braga CA, Souza GAAD, Mota EC. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. *Rev Epidemiol Control Infect*. 2013; 3(2): 45-49.
4. Staes C, Jacobs J, Mayer J, Allen J. Description of outbreaks of healthcare associated infections related to compounding pharmacies, 2000-2012. *Am J Health Syst Pharm*. 2013; 70(15): 1301-12.
5. Ruan Z, Yu Y, Feng Y. The global dissemination of bacterial infections necessitates the study of reverse genomic epidemiology. *Brief Bioinform*. 2020; 21(2): 741-750.
6. Quiles MG, Menezes LC, Bauab KC, Gumpel EK, Rocchetti TT, Palomo FS, et al. Diagnosis of bacteremia in pediatric oncologic patients by in-house real-time PCR. *BMC Infect Dis*. 2015; 15:283.
7. Santolaya ME, Farfan MJ, De La Maza V, Cociña M, Santelices F, Alvarez AM, et al. Diagnosis of bacteremia in febrile neutropenic episodes in children with cancer: microbiologic and molecular approach. *Pediatr Infect Dis J*. 2011; 30(11): 957-61.

8. Zboromyrska Y, Cilloniz C, Trigueiros-Cobos N, Almela M, Hurtado JC, Vergara A, et al. Evaluation of the Magicplex™ Sepsis Real-Time Test for the Rapid Diagnosis of Bloodstream Infections in Adults. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9:56.
9. Pilarczyk K, Rath PM, Steinmann J, Thielmann M, Padosch SA, Durbeck M, et al. Multiplex polymerase chain reaction to diagnose bloodstream infections in patients after cardiothoracic surgery. *BMC Anesthesiol.* 2019; 19: 59-70.
10. Zboromyrska Y, De La Calle C, Soto M, Sampietro-Colom L, Soriano A, Alvarez-Martínez MJ, et al. Rapid diagnosis of Staphylococcal catheter-related bacteraemia in direct blood samples by Real-Time PCR. *PLoS One.* 2016; 11(8): 161.
11. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(2): 485-493.
12. Hedman J, Radstrom P. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. *Methods Mol Biol.* 2013; 943:17-48.
13. Maukonen J, Simões C, Saarela M. The currently used commercial DNA-extraction methods give different results of clostridial and actinobacterial populations derived from human fecal samples. *FEMS Microbiol Ecol.* 2012; 79(3): 697-708.
14. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JA. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods.* 2000; 42(2): 139-47.
15. Bispo PJ, De Melo GB, Hofling-Lima AL, Pignatari AC. Detection and Gram discrimination of bacterial pathogens from aqueous and vitreous humor using real-time PCR assays. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52 (2): 873-81.
16. Furtado I, Xavier PC, Tavares LV, Alves F, Martins SF, Martins AS, et al. Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in blood of newborns with suspected nosocomial infection. *Rev Inst Med Trop.* 2014; 56(1): 77-80.
17. Carlesse F, Cappellano P, Quiles MG, Menezes LC, Petrilli AS, Pignatari AC. Clinical relevance of molecular identification of microorganisms and detection of antimicrobial resistance genes in bloodstream infections of paediatric cancer patients. *BMC Infect Dis.* 2016; 16(1): 462.

-
18. Wang HY, Kim S, Kim H, Kim J, Kim Y, Park SD, et al. Real-time PCR TaqMan assay for rapid screening of bloodstream infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014; 13: 3-13.
19. Nakayama Y, Yamaguchi H, Einaga N, Esumi M. Pitfalls of DNA quantification using DNA-binding fluorescent dyes and suggested solutions. *PLoS One* 2016; 11(3): 1-12.
20. Willner D, Daly J, Whiley D, Grimwood K, Wainwright CE, Hugenholtz P. Comparison of DNA Extraction methods for microbial community profiling with an application to pediatric bronchoalveolar lavage samples. *PLoS One*; 2012; 7 (4).
21. Morin N, Vallaëys T, Hendrickx L, Natalie L, Wilmotte A. An efficient DNA isolation protocol for filamentous cyanobacteria of the genus *Arthrospira*. *J Microbiol Methods.* 2010; 80(2): 148-54.
22. Stach JE, Bathe S, Clapp JP, Burns RG. PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001; 36(2-3):139-151.
23. Ghatak S, Muthukumaran RB, Nachimuthu SK. A simple method of genomic DNA extraction from human samples for PCR-RFLP Analysis. *J Biomol Tech.* 2013; 24(4): 224-231.
24. Ferreira ME, Grattapaglia D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.* 2 ed. Curitiba: Biosystems; 1996. p.220.
25. Neil CSO, Beach JL, Gruber TD. DNA Electrophoresis Using Thiazole Orange Instead of Ethidium Bromide or Alternative Dyes. *J Vis Exp.* 2019; 31(145).
26. Huang Q, Baum L, Fu WL. Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clin Lab.* 2010; 56(3-4): 149-152.
27. Salgado MM, Gonçalves MG, Higa FT, et al. Avaliação de resultados discrepantes obtidos na execução de PCR em tempo real em amostras de pacientes com suspeita clínica de meningite bacteriana. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2013; 72: 161-164.

28. Lin Q, Fu X, Liu L, Liang H, Guo H, Yin S, et al. Application and development of a TaqMan real-time PCR for detecting infectious spleen and kidney necrosis virus in *Siniperca chuatsi*. *Microb Pathog*. 2017; 107: 98-105.

29. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Schutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of real-time PCR into routine public health surveillance of culture negative bacterial meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS One*. 2011; 6(6): 206.

30. Zhang W, Cui S, Cheng XL, Wei F, Ma S. An optimized TaqMan real-time PCR method for authentication of ASINI CORII COLLA (donkey-hide gelatin). *J Pharm Biomed Anal*. 2019; 170(5): 196-203.