



UFRPE

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**

**ANÁLISE *in silico* DE INICIADORES DE GENES REFERÊNCIA UTILIZADOS
COMO NORMALIZADORES EM ESTUDOS UTILIZANDO qPCR PARA
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae***

RECIFE, 2019

BÁRBARA SCHNEYDER OLIVEIRA PEREIRA DA FONSECA

**ANÁLISE *in silico* DE INICIADORES DE GENES REFERÊNCIA UTILIZADOS
COMO NORMALIZADORES EM ESTUDOS UTILIZANDO qPCR PARA
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae***

Monografia, apresentada no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito da obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Anna Carolina Soares Almeida

Co-orientadora: Msc Crisvânia Pedrosa Dos Santos Nascimento

RECIFE, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

F676a Fonseca, Bárbara Schneyder Oliveira Pereira da
Análise *in silico* de iniciadores de genes referência utilizados
como normalizadores em estudos utilizando qPCR para avaliação da
expressão de isolados de *Klebsiella pneumoniae* / Bárbara Schneyder
Oliveira Pereira da Fonseca. – 2019.

53 f.: il.

Orientadora: Anna Carolina Soares Almeida.

Coorientadora: Crisvânia Pedrosa dos Santos Nascimento.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências
Biológicas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de Biologia, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. **Bactéria patogênica** 2. Microorganismos - Efeito dos
antibióticos 3. Drogas - Resistência em microorganismos
4. Normalização 5. Genes 6. Testes de sensibilidade bacteriana
I. Almeida, Anna Carolina Soares, orient. II. Nascimento, Crisvânia
Pedrosa dos Santos, coorient. III. Título

CDD 574

BÁRBARA SCHNEYDER OLIVEIRA PEREIRA DA FONSECA
ANÁLISE *in silico* DE INICIADORES DE GENES REFERÊNCIA UTILIZADOS
COMO NORMALIZADORES EM ESTUDOS UTILIZANDO qPCR PARA
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae*

Monografia, apresentada no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito da obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a Dr^a Anna Carolina Soares Almeida

Co-orientadora: Msc Crisvânia Pedrosa Dos Santos Nascimento

DATA DA APROVAÇÃO: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Anna Carolina Soares Almeida

Orientadora

Dra. Carolina Elzstein

Titular

Dra. Carina Lucena Mendes Marques

Titular

Msc. Paula Mariana Salgueiro de Souza

Suplente

Dedico este trabalho aos meus pais, pois se cheguei onde estou foi graças a todo o esforço deles desde meu nascimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Carlos e Roseane, por me permitirem alcançar meus sonhos e objetivos, pelo amor incondicional em todos os aspectos, por estarem ao meu lado em todos os momentos e por toda confiança depositada em mim: Amo vocês!

Ao meu amor, Eloy, por sempre acreditar em mim, inclusive nos momentos em que nem eu mesma acreditava, por ser a minha calma em meio ao caos. Por correr atrás de entender o que se passa, por mostrar que não preciso viver numa situação que me degrade, a me ensinar a me respeitar mais. Te amo muito, obrigada por ser o universo particular na minha vida.

Às minhas amigas de colégio, que mesmo longe estiveram mandando força, em especial a Bruna, conclui! Aos companheiros de curso, vocês me ajudaram das mais variadas formas a formar a minha visão como Bacharel em Ciências Biológicas. Em particular aos presentes que esse curso poderia me dar: Alexsandra, Jéssica, Milena, Renatta e Thayse. Principalmente Alexsandra e Thayse, o apoio de vocês, as aulas de campo, as aulas práticas, a todos os trabalhos, aos estudos coletivos, as noites juntas, os shows, a amizade. Vocês não tem noção do quanto eu fui e sou grata e feliz por todos os momentos, desculpem as minhas paranoias. Amo muito vocês!

Ao pessoal do tecido, Rúbia, Mariana e Clébia, vocês trouxeram mais prazer a minha vida, mais leveza, risadas e nos dias turbulentos: força, vocês foram o suporte de onde eu menos esperava. Vocês se integraram a minha vida. Gratidão!

Ao LRM, pela compreensão inicial, não foi fácil me integrar a vocês na mesma época em que perdi a minha maior fortaleza e minha vida parecia do avesso. Aos crescimentos e ensinamentos. Carol, por ter me aceito e dado um projeto. À Caroline por ter permitido que eu fizesse parte de algumas extrações de RNA; A Paula, por todo suporte ao longo do projeto ao qual pulei de paraquedas e também pelas risadas. Ana Paula e Michelly, pela troca durante a execução do projeto. Aos demais: Muito Obrigada!

A Rodrigo e Wendell, pela confiança, por me ajudar e permitir a dar os primeiros passos dentro do laboratório, por serem as melhores companhias sempre, por terem se tornado meus confidentes das situações de trabalho e de vida também.

A todos os laboratórios de todas as universidades públicas da RMR, por ceder, tempo, equipamento, conhecimento, principalmente acolhimento, fazer pesquisa nas condições que temos não é fácil.

E um agradecimento para lá de especial à Crisvânia, minha co-orientadora, obrigada pelo suporte, desculpa todo o incômodo. Obrigada por tornar real a minha conclusão, por correr atrás de uma solução, pelas correções e contribuições. Pela paciência, pela calma e pelo otimismo que você teve e passou para mim. Sem você essa monografia não existiria.

A todos que, de alguma forma, contribuíram tanto para a construção deste trabalho, quanto para a construção da Bárbara como pessoa e profissional. Me perdoem se os lapsos de memória me fizeram esquecer de citar seu nome aqui, mas saibam que eu sou imensamente grata!

RESUMO

A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria patogênica considerada “uma ameaça urgente à saúde humana”, pois é crescente o número de relatos de bactérias resistentes aos antibióticos, principalmente aos considerados de última linha para seu tratamento, como a colistina. Com isso, se faz necessário o entendimento de seus mecanismos de resistência, para saber as melhores formas de tratamento e desenvolver novas drogas para tratar as infecções. Para isso a PCR quantitativa em tempo real em estudos de expressão relativa se tornou uma das ferramentas mais eficazes a fim de compreender o funcionamento bacteriano a nível transcricional, porém para que os resultados sejam confiáveis e reais é necessária a realização da etapa de normalização, que dentre os possíveis o mais comum é por meio do uso de genes de referência. Porém a escolha dos genes a serem utilizados como normalizadores dentre os genes apontados pela literatura tem se mostrado controversa e, em muitos casos, com pouca confiabilidade. Essa dificuldade seria eliminada se houvesse um banco de dados robusto, para diversos tipos de estudos para espécies além de humanos e ratos. Assim, surgiu a necessidade de avaliar dentre os estudos expressão gênica bacteriana utilizando a qPCR, os genes utilizados como normalizadores e os iniciadores utilizados para amplificá-los. Em uma análise da literatura, disponível no Pubmed, os genes *16S* e *rpoB* foram os mais usados como normalizadores. Através de análises *in silico* feitas após a análise de literatura foi possível observar que de 38 sequências de pares de iniciadores analisados apenas quatro estavam dentro do padrão ideal sendo os melhores a serem utilizados em pesquisas posteriores, dentre as quatro apenas uma era referente a um dos genes mais utilizados, o *16S*.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, RT-qPCR, Normalização, estudos de expressão.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a pathogenic bacterium considered to be an "urgent threat to human health" because the number of antibiotic-resistant bacteria is increasing, especially those considered to be the last line for its treatment, such as colistin. For this it is necessary to understand their mechanisms of resistance to know the best forms of treatment and to develop new drugs to treat infections. For this purpose, real-time quantitative PCR in relative expression studies has become one of the most effective tools to understand bacterial functioning at the transcriptional level, but for the results to be reliable and real, it is necessary to perform the normalization step, which among the possible the most common is through the use of reference genes. However, the choice of the genes to be used as normalizers among the genes pointed out in the literature has been controversial and, in many cases, with little reliability. This difficulty would be eliminated if there were a robust database for various types of studies for species other than humans and rats. Thus, there was a need to evaluate among the bacterial gene expression studies using qPCR, as normalizing genes and the primers used to amplify them. In a literature review, available in Pubmed, the *16S* and *rpoB* genes were most commonly used as normalizers. Through in silico analysis after literature analysis it was possible to observe that the sequences of shared primer pairs were only smaller series within the ideal standard and the best ones in the future used in later experiments, among others only one referring to one of the genes most commonly used, the *16S*.

Key words: Bacterial resistance, RT-qPCR, Normalization, expression studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> em ágar MacConkey. Colônias Lactose-positivas. Cultivo 37° C, 24 horas. _____	2
Figura 2 Mecanismos de Resistência em Bactérias Gram-Negativas e os Antibióticos Afetados. _____	2
Fluxograma 1 Delineamento do trabalho _____	24
Gráfico 1 Trabalhos com <i>Klebsiella pneumoniae</i> utilizando qPCR por ano _____	27
Gráfico 2 Gráfico de dispersão para análise de distribuição de trabalhos com <i>K. pneumoniae</i> utilizando qPCR _____	28
Gráfico 1 proporção dos iniciadores de genes utilizados como normalizadores analisados__	28
Figura 3 Análise da especificidade do iniciadores através do Primer-Blast: A) <i>16S</i> de Peng et al., 2018 e Su et al., 2018; B) <i>gapA</i> de da Fonseca; Freitas; Vicente, 2011; C) <i>glnA</i> de Gomes et al., 2018 e D) <i>rpoC</i> de Gomes et al., 2018 _____	31

LISTA DE SIGLAS

AmpC – Ampicilina C

pb – pares de bases

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ESBLs – Beta Lactamases de Espectro Estendido

LPS – Lipopolissacarídeo

MDR – Multidroga resistente

MIQE – Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
(Informação Mínima para publicação de Experimentos de PCR Quantitativa em Tempo Real)

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR – quantitative Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase
quantitativa)

RNA – Ácido ribonucleico

RT-qPCR – Quantitative reverse transcription of Polymerase Chain Reaction (Reação em
Cadeia Polimerase quantitativa com Transcriptase Reversa)

STs – Sequência Tipo

XDR- Extensivamente resistente às drogas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
2.2. qPCR	17
2.2.1. Iniciadores.....	18
2.2.2. Normalização.....	19
3. JUSTIFICATIVA.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 OBJETIVO GERAL.....	23
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1. DELINEAMENTO DO TRABALHO.....	24
5.1.1. Seleção e organização dos trabalhos científicos.....	24
5.1.2. Análise dos iniciadores.....	25
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
9. APÊNDICE A.....	40
10. APÊNDICE B.....	44
11. ANEXO A.....	45

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae resistente a múltiplos medicamentos (MDR) foi sinalizada pela Organização Mundial de Saúde e pelo *Center for Disease Control* como “uma ameaça urgente à saúde humana”, por ser responsável por diversas doenças de alta mortalidade, incluindo pneumonia, infecções do trato urinário e infecções da corrente sanguínea, que estão se tornando tratáveis apenas com antibióticos de última linha, como a colistina. A colistina é um antibiótico polipeptídico de carga positiva da classe das polimixinas que se liga ao lípideo A na superfície celular bacteriana carregada negativamente, diminuindo a carga líquida, permeabilizando a membrana e culminando na lise celular (CAIN et al., 2018).

Estudos para melhor compreensão dos mecanismos de resistência ascendentes estão sendo realizados (MACNAIR et al., 2018; NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). Entretanto, a correta associação entre os perfis de expressão destes genes de resistência e os fenótipos observados ainda não é bem elucidada, mostrando a necessidade de estudos que gerem dados de análise de expressão com confiabilidade para posteriores conclusões e aplicações, como a melhor terapia para combater infecções causadas por tais patógenos bem como criação de novos antibióticos capazes de combatê-los com mais eficácia (AH; KIM; LEE, 2014).

Para a avaliação da expressão de genes de resistência, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR) constitui-se como uma ferramenta precisa, de análise simples, rápida e confiável. As aplicações podem ser classificadas como quantitativas ou qualitativas, e, dando ênfase a quantitativa, podemos classificar em quantitativa absoluta, que é utilizada para análise de carga viral/número de cópias de um determinado gene, baseando-se na comparação com um padrão cujo número de moléculas já é conhecido, e a quantitativa relativa, que é utilizada para ensaios de expressão gênica, tendo como objetivo avaliar mudanças entre dois grupos experimentais distintos (VANDESOMPELE et al., 2002).

Contudo, a aplicação desta metodologia é atrelada a uma etapa de seleção dos genes de expressão constitutiva a serem utilizados como controles internos para normalização das variáveis, como quantidade inicial de material analisado, eficiência enzimática e diferença de atividade transcricional entre células (VADESOMPELE et al., 2002).

Os iniciadores apontados pela literatura em muitos casos se mostram ineficientes, por deixarem de amplificar ou por amplificarem com baixa eficiência os genes a que são referentes. A normalização reflete na confiabilidade dos resultados e pode variar a depender do objetivo

do estudo (BUSTIN et al., 2009; SAVLI, 2003). Além da busca na literatura, haveria uma maior facilidade de escolha deles por meio de bancos de iniciadores, sendo alguns já existentes e funcionais, como o *RTprimerDB*, indicado pelo guia de Informação Mínima para publicação de Experimentos de PCR Quantitativa em Tempo Real - *MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR)* que é um conjunto de diretrizes que descreve as informações mínimas necessárias para avaliar experimentos de qPCR, que visam direcionar a confiabilidade dos resultados para ajudar a garantir integridade na literatura científica, promover consistência entre laboratórios e aumentar a transparência (BUSTIN et al., 2009). Porém, este banco abarca em sua grande maioria iniciadores de eucariotos, como humanos e ratos (PATTYN, 2003, 2006).

Assim, evidenciou-se a necessidade de revisar e analisar os genes utilizados como normalizadores e seus iniciadores encontrados na literatura para selecionar dentre eles os melhores para serem utilizados como normalizadores em estudos de expressão gênica, objetivando assim, organizar um banco de dados de genes normalizadores e seus iniciadores a serem utilizados em estudos posteriores, levando em consideração as diretrizes estabelecidas pelo *MIQE*.

Baseado na importância clínica, científica e na necessidade da realização da qPCR para um melhor entendimento dos mecanismos de resistência citados, torna-se necessária uma avaliação da qualidade dos iniciadores utilizados como normalizadores, visto que são parte fundamental na confiabilidade dos resultados de expressão gênica. Visando a potencialização de pesquisas posteriores, quanto às opções de iniciadores e seus parâmetros, sendo de extrema importância para o meio acadêmico, e conseqüentemente à sociedade.

Este trabalho realizou uma análise *in silico* de diferentes iniciadores descritos por diversos autores utilizados para amplificar os genes normalizadores, para verificar a sua confiabilidade e sensibilidade, selecionando por parâmetros como: fluoróforo utilizado, tamanho de fragmento, amplificação do fragmento na ferramenta PCR *in silico*, entre outros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella spp. são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e não-móveis, pertencentes à família Enterobacteriaceae (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2015), possuindo 77 antígenos capsulares (antígenos K), levando a 13 diferentes sorotipos. Essas cápsulas polissacarídicas bem desenvolvidas dão às colônias sua aparência mucóide característica quando cultivadas em meio sólido. No ágar MacConkey, as colônias tipicamente parecem grandes, mucóides e róseas, com o pigmento geralmente se difundindo no ágar circundante, indicando fermentação da lactose e produção de ácido (Figura 1) (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2015). Taxonomicamente, as espécies do gênero *Klebsiella* são classificadas em *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica*, *K. pneumoniae*, e esta compreende as subespécies: *pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis* (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).



Figura 1 *Klebsiella pneumoniae* em ágar MacConkey. Colônias Lactose-positivas. Cultivo 37 ° C, 24 horas. Fonte: microbiologvinpictures.com

Sendo considerada uma das principais espécies causadoras de infecções hospitalares e comunitariamente adquiridas (SIU et al., 2012), podem causar bacteremia e infecções hepáticas, e foram isoladas de várias infecções incomuns, incluindo endocardite, peritonite, colecistite aguda, mionecrose crepitante, piomiosite, fascíte necrosante, infecções do espaço fascial de cabeça e pescoço e artrite séptica (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2015). Estas infecções são em geral associadas ao uso de dispositivos invasivos, como os cateteres, indicando a importância da adesão bacteriana e formação de biofilme (estrutura complexa de microrganismos, envoltos por uma matriz extracelular de polissacarídeos, aderidos entre si a

uma superfície ou interface) para o estabelecimento da infecção (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; WU et al., 2010).

Como patógenos oportunistas, infectam principalmente indivíduos imunocomprometidos que sofrem de doenças subjacentes graves, sendo responsáveis por alta taxa de mortalidade e com relatos cada vez mais frequentes em surtos hospitalares. Em conjunto, a resistência a vários antimicrobianos apresentada por estas bactérias tem levado a uma terapia limitada (DZIDIC, 2008; PODSCHUN; ULLMANN, 1998) e está entre as três maiores causadoras de infecções hospitalares no Brasil (ANVISA, 2016).

A resistência em *K. pneumoniae* pode desenvolver-se por mutação, como a resistência às fluoroquinolonas, ou por aquisição de elementos genéticos móveis (figura 2). *K. pneumoniae* carrega um gene de resistência (betalactamase localizado no cromossomo) que naturalmente torna as penicilinas com um espectro estendido ineficazes. A resistência a outras drogas antibacterianas orais amplamente utilizadas e disponíveis, como o cotrimoxazol e as fluoroquinolonas, surgiu e se espalhou globalmente. As altas proporções de resistência à cefalosporina na espécie (mediada por ESBLs ou pela enzima adquirida AmpC) também

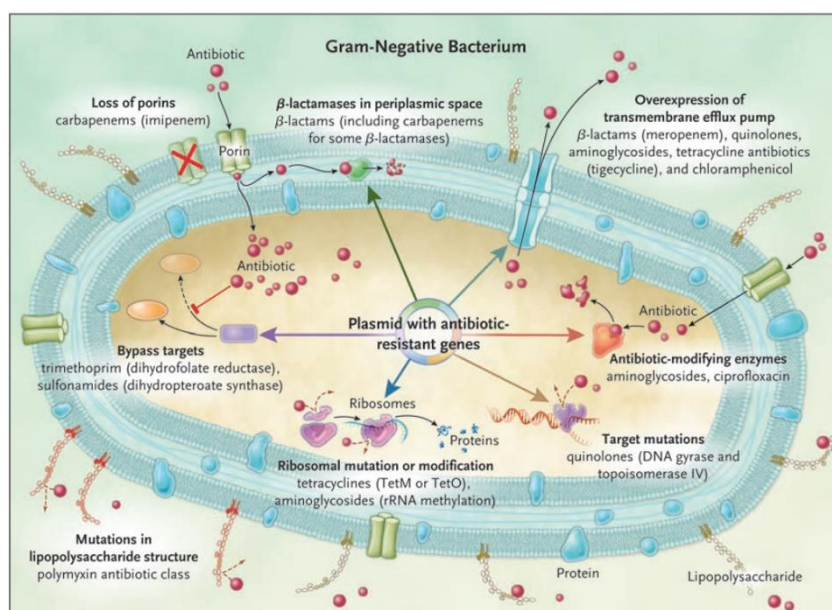


Figura 2 Mecanismos de Resistência em Bactérias Gram-Negativas e os Antibióticos Afetados. Fonte: Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. (2010).

significa que o tratamento para suspeita de infecções graves por *K. pneumoniae* em muitas situações se restringiram aos carbapenêmicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Dada à ampla disseminação de isolados *K. pneumoniae* resistentes e o uso de carbapenêmicos, emergiram relatos de isolados produtores de carbapenemases, enzimas capazes de inativar estes antimicrobianos (figura 2) (MEYER; PICOLI, 2011). *K. pneumoniae*

é hoje a principal causa de infecções causadas por bactérias resistentes a carbapenêmicos no mundo todo. Todos os genes mais importantes que podem conferir resistência aos carbapenêmicos (via produção carbapenemase) foram detectados em cepas de *K. pneumoniae*, tornando assim quase todas as opções de tratamento disponíveis ineficazes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Com isso, a prática clínica vem enfrentando desafios decorrentes do surgimento de isolados bacterianos multirresistentes no Brasil e em todo o mundo, por apresentarem opções terapêuticas cada vez mais limitadas (FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIYOU, 2010).

Nesse contexto, os antibióticos da classe das polimixinas (polimixina B e colistina) vêm se tornando um dos últimos recursos efetivos para tratamento de tais infecções. No entanto, relatos de emergência de isolados de *K. pneumoniae* resistentes a colistina têm sido cada vez mais comuns (CANNATELLI et al., 2013). A resistência a colistina envolve alterações no lipopolissacarídeo (LPS), que resultam no impedimento da interação do antibiótico com seu alvo (GUNN et al., 1998). Embora alguns trabalhos tenham elucidado alguns dos mecanismos subjacentes à resistência à polimixinas, uma grande quantidade de informação ainda precisa ser esclarecida, pois existem cepas resistentes para as quais os mecanismos de resistência ainda não foram explicados. Esses achados são de suma importância, dada a atual importância das polimixinas na prática clínica e o aumento da resistência bacteriana a essas drogas (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

Com este histórico, *K. pneumoniae* está entre os oito patógenos listados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), por estarem continuamente sendo reportados com taxas crescentes de resistência a antibióticos, para desenvolvimento de mais pesquisas e também novos antibióticos para o tratamento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Diversos mecanismos moleculares em genes cromossômicos, relacionados à resistência às polimixinas, foram descritos em *K. pneumoniae*, a maioria deles resultando em modificação do lipídio A na membrana externa (POIREL et al., 2018; STORM; ROSENTHAL; SWANSON, 1977), embora ainda existam alguns isolados exibindo mecanismos inexplicáveis (BARON et al., 2016). Por isso além de estudos para identificar possíveis mutações ou genes diretamente ligados a resistência, é importante estudar os mecanismos transcricionais bacterianos afim de poder compreender de que forma ela se comporta na presença do antibiótico e o que pode ser feito para ter um tratamento eficaz.

2.2.qPCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma das tecnologias mais poderosas da biologia molecular. Utilizando PCR, sequências específicas dentro de um molde de DNA ou cDNA podem ser copiadas, ou “amplificadas”, muitos milhares a um milhão de vezes utilizando pequenos oligonucleótidos (iniciadores) específicos de sequência, DNA-polimerase estável ao calor e ciclagem térmica. Na PCR tradicional a detecção e quantificação da sequência amplificada são realizadas no final da reação, após o último ciclo de PCR, e envolvem a análise pós-PCR, tais como eletroforese em gel e análise de imagem. Já na PCR quantitativa em tempo real, proposta por Higuchi et al. Em 1993, o produto de PCR é medido em cada ciclo. Ao monitorar as reações durante a fase de amplificação exponencial da reação, os usuários podem determinar a quantidade inicial de alvo com grande precisão (DORAK, 2007).

Nos últimos anos, a PCR em tempo real tornou-se a principal ferramenta para a detecção e quantificação de DNA ou RNA, pelas suas principais vantagens como: a capacidade de monitorar o progresso da reação de PCR como ocorre em tempo real, a possibilidade de medir com precisão a quantidade de *amplicon* (produto de PCR) em cada ciclo, o que permite uma quantificação altamente precisa da quantidade de material de partida em amostras, um aumento na faixa dinâmica de detecção e a eliminação das manipulações pós-PCR já que amplificação e a detecção ocorrem em um único tubo (BUSTIN, 2002; VANDESOMPELE et al., 2002).

Na PCR em tempo real, existem três etapas principais que compõem cada ciclo em uma reação de PCR em tempo real: a desnaturação, o anelamento e a extensão, e as reações geralmente são executadas por 40 ciclos. A quantidade de DNA é medida após cada ciclo através de corantes fluorescentes que produzem um sinal fluorescente crescente em proporção direta ao número de moléculas de produto de PCR geradas. Os dados recolhidos na fase exponencial da reação fornecem informação quantitativa sobre a quantidade inicial do alvo de amplificação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016). Além das etapas básicas da técnica, existem dois métodos de quantificação: o absoluto e o relativo. A quantificação absoluta determina o número real de cópias do alvo, mas é também a forma de quantificação mais trabalhosa e difícil. Este método requer um planejamento cuidadoso e uma curva padrão altamente precisa. A quantificação absoluta é frequentemente usada para determinar carga viral. Já a quantificação relativa ainda requer um planejamento cuidadoso, mas os dados gerados são relativos à abundância relativa, e não ao número de cópias exatas. Este é o método de escolha para estudos de expressão gênica e oferece duas opções principais para quantificação: $\Delta\Delta C_t$ e quantificação de curva padrão (DORAK, 2007; SVEC et al., 2015).

Existem basicamente três métodos comumente utilizados para detecção dos alvos de RNA ou cDNA na qPCR, mas em cada caso há uma baixa emissão de fluorescência no início e cresce gradativamente a cada ciclo, de acordo com a amplificação, o que leva a quantificação. Pode-se utilizar fluoróforos de ligação ao DNA não específicos em geral (por exemplo, SYBR[®] Green I), iniciadores marcados com fluoróforo (por exemplo, LUX) ou sondas específicas para sequências (por exemplo, Scorpions) (BUSTIN, 2005). Dentre eles, o SYBR[®] Green I possui algumas vantagens em relação aos demais fluoróforos como relativa simplicidade, mesmo sendo inespecífico, e custo reduzido dentro do experimento (PONCHEL et al., 2003). Com isso, identificação precisa do pico alvo depende da amplificação do alvo puro, para tal, cada componente e suas concentrações para a eficiência na técnica é de grande importância, bem como a estrutura onde se trabalha para realiza-la. Porém existem etapas de suma importância para o delineamento do experimento: a escolha e/ou desenho dos iniciadores, que implica diretamente na eficiência do ensaio bem como a normalização do ensaio, para que os resultados gerados sejam robustos, confiáveis e verdadeiros (SVEC et al., 2015).

2.2.1. Iniciadores

Os iniciadores devem ser projetados de acordo com as diretrizes padrão de PCR sendo específicos para a sequência alvo e estar livres de estrutura secundária interna, levando em consideração que o comprimento do *amplicon* deve ser entre 60 a 200 pb, uma vez que produtos mais longos não são amplificados com a mesma eficiência. Em geral, os iniciadores devem ter 18 a 24 nucleotídeos de comprimento, pois fornece temperaturas práticas de anelamento. Os pares de iniciadores devem ter temperaturas de fusão compatíveis (com diferença dentro de 1°C entre o par) e conter aproximadamente 50% de conteúdo de GC, se não podem formar híbridos imperfeitos e estáveis. Se possível, a extremidade 3' do iniciador deve ser rica em GC (grampo GC) para aprimorar o anelamento da extremidade que será estendida. Além de analisar sequências de pares de iniciadores para evitar complementaridade e hibridação entre iniciadores (dímeros de iniciadores), os iniciadores devem evitar trechos de nucleotídeos repetidos, uma vez que estes podem hibridizar de forma inadequada. Para confirmar a especificidade de iniciadores, deve-se realizar uma pesquisa do BLAST em bancos de dados públicos para ter certeza de que os iniciadores reconhecem apenas o alvo de interesse, evitando tanto formação de dímeros e alças quanto amplificação de alvo inespecífico (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016; DORAK, 2007).

Para facilitar a escolha de iniciadores foi criado o *PrimerBank*, um banco de dados online de iniciadores, com uma interface *web* de acesso livre (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>). Nele existem várias maneiras de procurar por

iniciadores: número de acesso no *GenBank*, acesso à proteína pelo *NCBI*, ID do gene, ID do *PrimerBank*. O *PrimerBank* contém atualmente mais de 300.000 iniciadores projetados para a maioria dos genes humanos e de camundongos conhecidos. Este site também apresenta um protocolo experimental detalhado para PCR em tempo real do SYBR[®] Green e questões comuns relacionadas à PCR em tempo real (DORAK, 2007). Além do *PrimerBank* existe também o *RTprimerDB*, que é um banco de dados público e de análise para aplicações de qPCR hospedado no Centro de Genética Médica do Hospital Universitário de Gent, Bélgica. O banco de dados foi inicialmente desenvolvido para abordar o problema de escolha e desenho de iniciadores e avaliação de ensaios para quantificação ou detecção das mesmas sequências de ácido nucléico por diferentes indivíduos, o que impede significativamente ensaios padronizados e uniformes. Portanto, o objetivo principal do banco de dados era a implantação de uma interface web para encontrar informações de iniciadores e sondas em ensaios de qPCR validados experimentalmente submetidos por colegas no campo de PCR em tempo real (PATTYN, 2003).

O *RTPrimerDB* fornece identificadores únicos (*RTPrimerDB IDs*) para testes qPCR validados, preferencialmente publicados em periódicos revisados. Diferentemente do *PrimerBank*, esse possui outros tipos de organismos e inclusive já incluiu em seu banco um organismo procarionte. Os dados que são mantidos incluem todas as informações necessárias para entender o propósito de um ensaio e implementá-los em um experimento. Adicionalmente, para ensaios de expressão gênica, contém informação sobre o alinhamento de iniciadores e sondas nos transcritos gênicos conhecidos, junto com a análise de estrutura secundária de *amplicon* baseado no algoritmo *mfold*. Além de os usuários que testaram um iniciador do banco de dados poder dar o feedback sobre o desempenho do ensaio em termos de especificidade, sensibilidade e eficiência de reação (PATTYN, 2006).

2.2.2. Normalização

A PCR em tempo real tornou-se um método de escolha para a análise da expressão gênica. A eliminação das inconsistências experimentais deve ser uma preocupação primordial para o projeto experimental de PCR em tempo real. Desviar-se do plano experimental pode limitar a capacidade dos pesquisadores de comparar dados e levar a conclusões errôneas se os desvios não forem considerados na análise. As fontes da variabilidade experimental incluem a natureza e a quantidade da amostra inicial, o processo de isolamento do RNA, a transcrição reversa e a amplificação por PCR em tempo real (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004)

A normalização é essencialmente o processo de neutralizar os efeitos da variabilidade dessas fontes. Embora existam estratégias individuais de normalização em cada estágio da PCR em tempo real, algumas são mais eficazes que outras. Estas estratégias incluem: normalização

da quantidade da amostra, seria iniciar o isolamento de DNA ou RNA com uma quantidade semelhante de amostra, podendo minimizar a variabilidade, porém é apenas aproximado e não aborda desvios no isolamento do RNA. Normalizando a quantidade de RNA ou DNA, para que a quantificação seja precisa uma avaliação de qualidade das amostras de RNA ou DNA é necessária, mas é insuficiente como o único método para normalização, porque ela não controlam as diferenças de eficiência na transcrição reversa (RT) e reações de qPCR; a pipetagem também está sujeita à variação do operador e não é normalizada com a análise de RNA pós-purificação; e, através da normalização por um gene de referência (DORAK, 2007; HUGGETT et al., 2005).

O uso de um gene normalizador (também chamado de gene de referência ou controle endógeno) é o método mais completo de abordar quase todas as fontes de variabilidade na qPCR. No entanto, para este método funcionar, o gene deve estar presente em um nível consistente em todas as amostras comparadas. Um gene normalizador eficaz controla a qualidade e a quantidade de RNA e as diferenças nas eficiências de amplificação por PCR em tempo real e RT. Se a RT transcreve ou a DNA polimerase amplifica um alvo em taxas diferentes em duas amostras diferentes, o transcrito do normalizador refletirá essa variabilidade. Genes de referência endógenos, como um gene de expressão constitutiva, ou alvos exógenos de ácido nucléico podem ser usados. Para obter perfis de expressão precisos e reprodutíveis de genes selecionados usando PCR em tempo real, é fundamental usar produtos de genes de controle interno confiáveis para a normalização dos níveis de expressão entre os experimentos - tipicamente, produtos de expressão de genes de manutenção celular são usados (HUGGETT et al., 2005; LING; SALVATERRA, 2011).

O alvo escolhido para ser o padrão interno (ou controle endógeno) deve ser expresso aproximadamente no mesmo nível que o produto do gene experimental. Utilizando um controle endógeno como uma referência ativa, a quantificação de um alvo de mRNA pode ser normalizada para diferentes na quantidade de RNA total adicionado a cada reação. Independentemente do gene escolhido para atuar como controle endógeno, esse gene deve ser testado sob todas as condições experimentais, para assegurar que exista uma expressão consistente do gene de controle sob todas as condições, pois a depender do estudo feito e das condições a que a célula ou tecido vá ser exposto e analisado pode haver uma variação da sua expressão (BUSTIN et al., 2009) .

Dessa forma, a normalização é um componente essencial de um ensaio qPCR, uma vez que controla as variações no rendimento da extração, no rendimento da transcrição reversa e na

eficiência da amplificação, permitindo comparações das concentrações de mRNA em diferentes amostras. O uso de genes de referência como controles internos é o método mais comum para normalizar os dados do RNAm celular (HUGGETT et al., 2005), sua utilidade deve ser validada experimentalmente para determinados tecidos ou tipos de células e delineamentos experimentais específicos. E muitas análises moleculares ainda contêm dados qPCR que são pouco normalizados (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004; BUSTIN et al., 2009; PFAFFL, 2001; VANDESOMPELE et al., 2002).

3. JUSTIFICATIVA

O nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos da expressão de genes de resistência por qPCR e a escolha dos genes a serem utilizados como normalizadores dentre os genes apontados pela literatura tem se mostrado controversa e, em muitos casos, com pouca confiabilidade. Essa dificuldade seria eliminada se houvesse um banco de dados robusto, como o *PrimerBank*, onde houvesse genes e seus respectivos iniciadores validados para diversos tipos de estudos para espécies além de humanos e ratos. Assim, surgiu a necessidade de avaliar dentre os estudos expressão gênica bacteriana utilizando a qPCR, os genes utilizados como normalizadores.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar *in silico* de iniciadores de genes referência utilizados como normalizadores em estudos utilizando qPCR para avaliação da expressão de isolados de *Klebsiella pneumoniae*

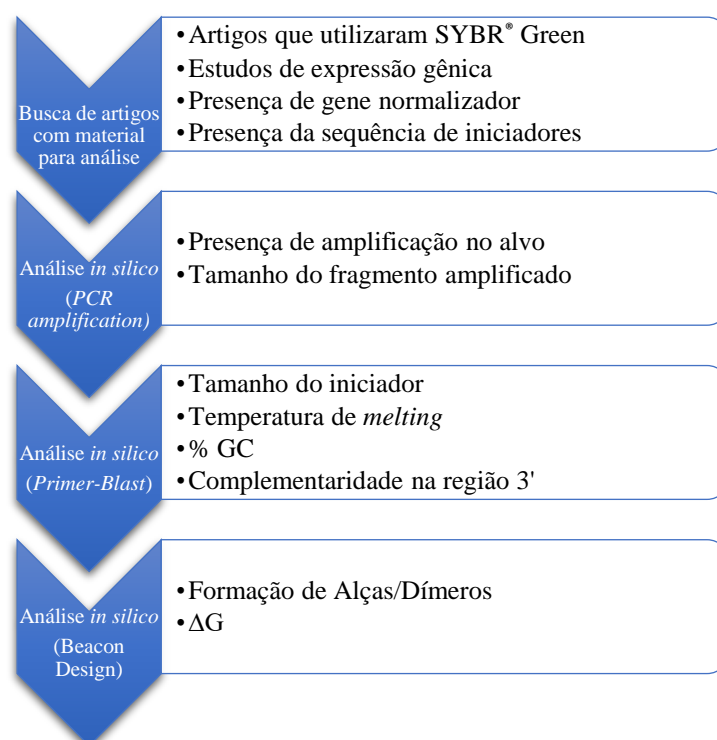
4.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os estudos utilizando o fluoróforo SYBR[®] Green em estudos com *K. pneumoniae* através de qPCR
- Verificar a presença das sequências de iniciadores de genes de referência em estudos com *K. pneumoniae* através de qPCR utilizando SYBR[®] Green.
- Revisar os genes de referência mais utilizados para normalização em estudos com *K. pneumoniae* através de qPCR.
- Analisar os iniciadores dos genes de referência de *K. pneumoniae* de acordo com normas estabelecidas internacionalmente
- Criar um banco de iniciadores para serem utilizados em pesquisa de resistência bacteriana posteriormente.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. DELINEAMENTO DO TRABALHO

Esse estudo trata-se de uma revisão da literatura acerca dos genes de referência e seus respectivos iniciadores utilizados em estudos de expressão gênica em *Klebsiella pneumoniae* feitos por meio da técnica qPCR. Foram analisados 112 trabalhos publicados do período de 2009 a 2018, sem preferência quanto a nacionalidade dos artigos publicados, por ter sido o período a qual compreendia trabalhos de expressão gênica com a referida bactéria utilizando qPCR e SYBR® Green como o fluoróforo.



Fluxograma 1 Delineamento do trabalho. Fonte: Autor

5.1.1 Seleção e organização dos trabalhos científicos

Para a consulta dos artigos e demais trabalhos científicos foi utilizado a ferramenta de pesquisa PubMed presente no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando o seguinte descritor (em inglês): “*Klebsiella pneumoniae* Real-time PCR. Após a leitura dos trabalhos científicos, foram selecionados os que apresentavam as informações condizentes com os objetivos propostos (fluxograma 1):

- Estudos de Expressão gênica;
- Estudos utilizando SYBR® Green como fluoróforo;
- Estudos com a presença de genes normalizadores;
- Estudos com a presença da sequência dos iniciadores dos genes normalizadores;

5.1.2. Análise dos iniciadores

Foram analisados iniciadores obedecendo as diretrizes do *MIQE* (2013) e os parâmetros indicados pelo Manual da *Applied Biosystems* (2016). Após a seleção, os pares de iniciadores foram submetidos a plataforma *In silico* PCR amplification (<http://insilico.ehu.es/PCR/>) e foi verificado se havia amplificação para as cepas de *K. pneumoniae*, os que não amplificaram foram excluídos imediatamente das análises seguintes bem como os que apresentaram amplificação acima de 200 pares de base, então foram selecionados os que geravam amplicons entre 60 e 200 bases.

Posteriormente, estes foram analisados através da ferramenta *Primer-Blast* do *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para análise dos parâmetros considerados ideais, pois quando não se encontram dentro dos parâmetros eles podem apresentar problemas em relação a eficiência:

- Tamanho do iniciador entre 18 e 28 nucleotídeos: que implica na especificidade, e eficiência.
- Diferença menor que 1°C na temperatura de *melting* entre o par de iniciadores: que influencia na eficiência da reação.
- Percentual de Guanina (G) e Citosina (C) aproximadamente de 50% (não menor que 30% e maior que 80%): influencia na qualidade da ligação do iniciador com o alvo, sendo assim, na eficiência da reação
- Pontuação menor que 2.00 na complementaridade da extremidade 3': extremidade que precisa ficar livre, pois é justamente onde a enzima Taq polimerase se liga pra alongar a cadeia complementar do alvo. Essa informação implica na formação de alças e dímeros.

Após a exclusão dos pares de iniciadores que não se encaixavam dentro dos parâmetros ideais foi feita uma análise na versão gratuita do *Beacon Design* da *Premier Biosoft International* (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>) para:

- Formação de alças/grampos: quando eles se complementam dentro da propria sequencia do iniciador, se fechando, levando ao formato de alça/grampo.
- Formação de dímeros: quando as sequências de iniciadores se complementam (*Foward – Foward, Reverse -Reverse* e/ou *Foward – Reverse*)

- Energia livre de Gibbs (ΔG): que é a energia necessária para quebrar as possíveis ligações formadas na extremidade 3' citadas acima, estas que interferem na eficiência do iniciador e conseqüentemente da reação.

Além de uma análise complementar com a ferramenta *Primer-Blast* para ver se os iniciadores eram específicos apenas para *K. pneumoniae* ou se amplificavam para outras espécies de bactérias (fluxograma 1).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da busca foi um total de 177 artigos, desses 112 realmente foram trabalhos que utilizavam qPCR em estudos com *K. pneumoniae* (Gráfico 1; APÊNDICE B). Foi possível observar o aumento de trabalhos utilizando a técnica ao longo dos anos, destacando-se os anos de 2012 e 2016 (Gráfico 1 e 2). Em 2012 devido ao aumento nos relatos de cepas resistentes aos carbapenêmicos, mais estudos para identificação e expressão desses genes foram realizados (CLIFFORD et al., 2012; NAPARSTEK et al., 2012; SRINIVASAN et al., 2012; VELEBA et al., 2012; WANG; GU; LU, 2012a, 2012b; ZULFIQAR; SHAKOORI, 2012). Em 2016 devido ao aumento no relato de cepas resistentes a colistina e tigeciclina, responsáveis no tratamento de bactérias extensivamente resistentes (XDR) (AHN et al., 2016; AZIMI et al., 2016; CHENG et al., 2016; CHOI; KIM; KO, 2016; DU et al., 2016; LIU et al., 2016; YUHAN et al., 2016).

Dentro dos 112 trabalhos, 49 utilizaram SYBR[®] Green como fluoróforo, os demais utilizaram outros fluoróforos, a maioria utilizou-se de sondas, principalmente TaqMan (APÊNDICE B). Desses 49 artigos, 27 fizeram estudos de expressão e 1 foi um estudo para validar genes a serem utilizados como normalizadores em estudo de expressão em 2018. E dentro desses 27 trabalhos, nenhum, apresentou mais que um gene como normalizador. (THELLIN et al., 1999), porém estudos demonstram que a expressão de um gene constitutivo, que normalmente é escolhido como normalizador, pode variar consideravelmente, e como as conclusões são dependentes do controle aplicado se o escolhido não for um bom controle, as

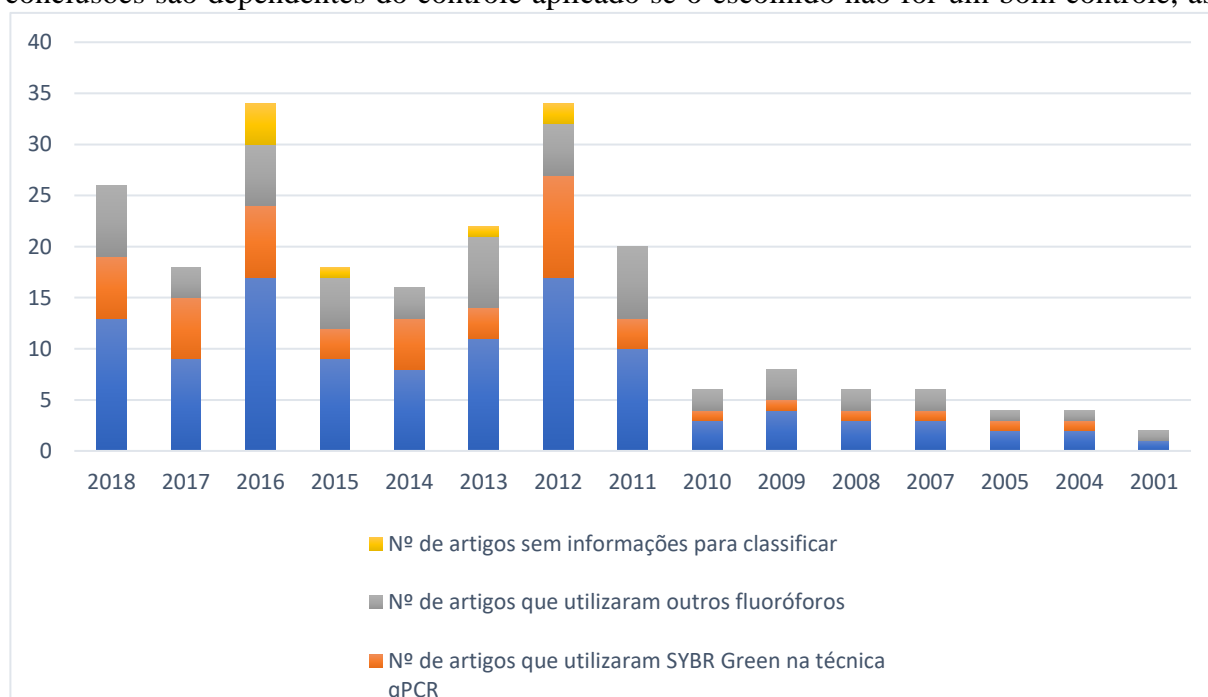


Gráfico 2 Trabalhos com *Klebsiella pneumoniae* utilizando qPCR por ano. Fonte: Autor

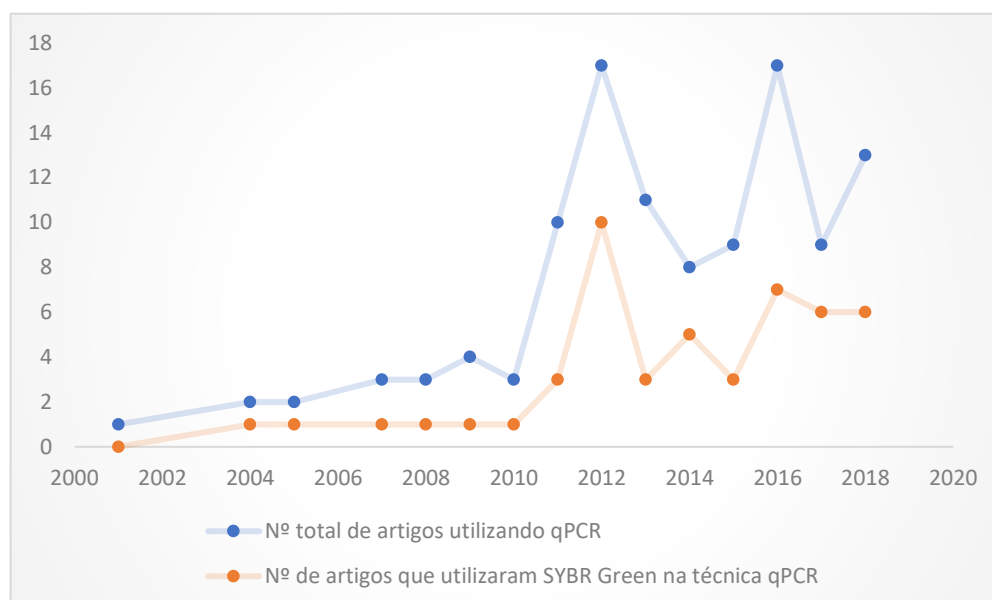


Gráfico 3 Gráfico de dispersão para análise de distribuição de trabalhos com *K.pneumoniae* utilizando qPCR. Fonte: Autor.

respostas obtidas podem estar distorcidas da realidade, por isso se tornou inaceitável uma única referência, a menos que os pesquisadores mostrem que essa referência possui expressão invariável na célula avaliada sob condições experimentais descritas (BUSTIN et al., 2009). Por isso foi criado um método para escolha do gene mais estável dentro do estudo a ser feito, com as células e/ou tecidos alvos, além de determinar o número ideal de genes a serem utilizados como normalizadores, através do geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). Dentre os informados o *16S* foi o gene mais escolhido, sendo o dentre todo gene ou suas partes, como, *rrsA*, *rrsE* e *rrsH*, (13/38) seguido do *rpoB* (6/38), como pode ser observado no gráfico 3 e no APÊNDICE A.

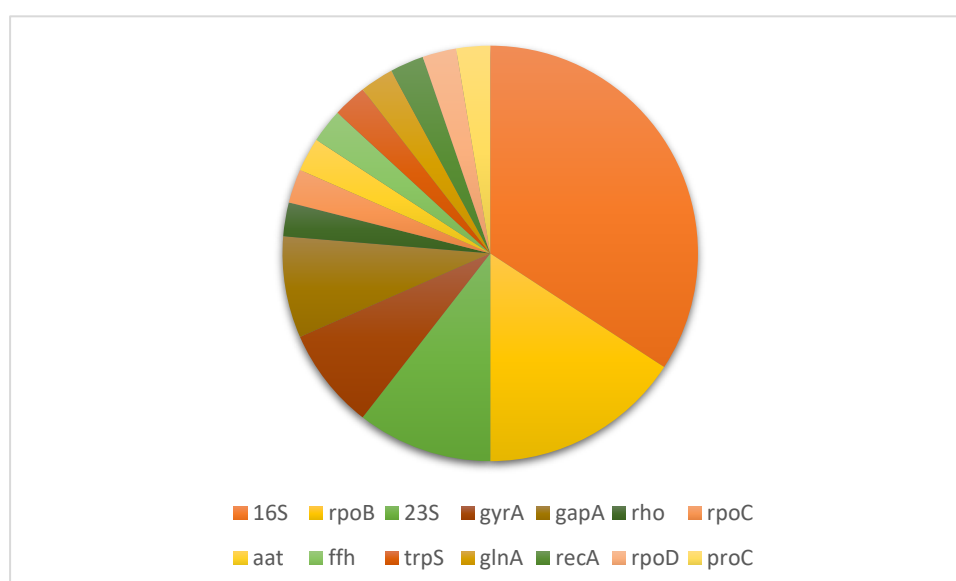


Gráfico 4 proporção dos iniciadores de genes utilizados como normalizadores analisados. Fonte: Autor.

No entanto, existem restrições quanto ao uso de um RNA ribossômico para a normalização dos RNA mensageiros. Em primeiro lugar, os genes de RNA ribossômico não são recomendados para a análise da RT-qPCR devido à alta abundância de transcritos desse gene, o que dificulta a quantificação de transcritos de RNAm raros e menos abundantes. Essa alta abundância também requer a diluição das amostras de cDNA antes das reações de RT-qPCR, aumentando assim os riscos de erros de diluição. Em segundo lugar, os RNAs ribossômicos e mensageiros apresentam tempos de vida distintos dentro da célula, o que dificulta a comparação entre eles. Embora os RNAs mensageiros apresentem rápida reversão de acordo com as condições fisiológicas de uma bactéria, o RNA ribossômico é degradado apenas sob certas condições de estresse. Em terceiro lugar, alguns estudos sugeriram que a expressão de genes de RNA ribossômico pode estar sob algum controle regulatório, o que vai contra a característica de expressão constitutiva que é essencial para qualquer controle endógeno (GOMES et al., 2018).

Após os 28 trabalhos terem sido selecionados com base nos critérios estabelecidos, foi iniciada a análise que pode ser observada no APÊNDICE A. Dentre eles, 4 não puderam ser analisados por falta da sequência dos iniciadores. Segundo o *MIQE* essa é uma informação considerada essencial e deve estar presente em todo trabalho que faça uso desses oligonucleotídeos (BUSTIN et al., 2009). Por falta de amplificação em cepas de *K. pneumoniae* na ferramenta “*in silico* PCR Amplification” foram excluídos três. Quatro dos pares de iniciadores foram excluídos pois não apresentavam amplificação na maioria das cepas de *K. pneumoniae* na mesma ferramenta. Dois pares de iniciadores idênticos foram utilizados por dois autores diferentes, porém a referência não foi citada em nenhum dos dois trabalhos (VAN LAAR et al., 2015; ZULFIQAR; SHAKOORI, 2012). Iniciadores que não geram amplificação em todas as cepas de *K. pneumoniae* não podem ser considerados específicos da espécie, podendo amplificar apenas STs específicos, isso não anula sua eficiência, porém ele se torna de uso limitado, o que pode fugir ao objetivo do estudo. Cinco pares de iniciadores foram excluídos, pois amplificam fragmentos acima de 200 pb, sendo dois pares de iniciadores dentre eles iguais também. Amplificações maiores que 200 pb influenciam na eficiência da reação como um todo, podendo diminuí-la, por isso é recomendável escolha de iniciadores que amplifiquem abaixo desse limite, além de ser considerada essencial ser informada no estudo publicado (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016; BUSTIN et al., 2009). A literatura também sugere que, em estudos de análise de expressão de diversos genes, o tamanho de todos os *amplicons*

deve ser semelhante. Visto que, substâncias como SYBR[®], vão produzir fluorescência de maior intensidade em produtos de amplificação maiores (THORNTON; BASU, 2011).

Dentre os que foram analisados pela ferramenta *Primer-Blast*: todos se encontravam dentro do tamanho ideal para um iniciador, sete foram excluídos pela diferença maior que 1°C na Temperatura de *melting* (T_m) entre os iniciadores que formavam o par, quatro obtiveram um *score* maior que 2.00 em relação a complementaridade da extremidade 3' e seis foram excluídos por apresentarem tanto a diferença de maior que 1°C na T_m quanto o *score* acima de 2.00 em relação a complementaridade da extremidade 3'. São regras recomendadas para melhor eficiência da reação e maior confiabilidade dos resultados dos estudos, principalmente com relação a extremidade 3' quanto maior o *score* maior a possibilidade de formação de dímeros e alças, um mau-pareamento nessa extremidade tem um maior impacto na especificidade deste iniciador e conseqüentemente na eficiência da reação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016). Segundo ROCHA (2017), após a publicação do *MIQE guidelines* em 2009 até o ano de 2015, houve um aumento de publicações que se preocupassem em testar e validar genes de referência bacterianos em RT-qPCR, assim como o número de citações referentes a estes estudos, e foi possível identificar os genes mais testados e mais validados, porém dentre todos os artigos analisados apenas o artigo que trata da normalização de genes de referência em *K. pneumoniae* de GOMES et al. (2018) trouxe informações de forma detalhada como indicado pelo guia.

Dos cinco iniciadores contidos dentro dos parâmetros indicados, dois pares possuíam a mesma sequência, por isso foram realizadas quatro análises no *Beacon Design* da *Premier Biosoft International*. Entre os analisados, todos possuem possibilidade de formação de dímero e/ou alças, além de todos também apresentarem um ΔG relativamente alto (Anexo A). Alguns estudos investigaram os efeitos dos maus-pareamentos entre iniciador e alvo, e demonstrou que o alvo pode ser amplificado mesmo com pequenos maus-pareamentos dentro do primer (GHEDIRA et al., 2009; SIPOS et al., 2007; WHILEY; SLOOTS, 2005), no geral um mau-pareamento na região 3' afeta muito mais do que na região 5' e essa análise deve ser feita de forma individual e detalhada (YE et al., 2012). Complementarmente nenhum destes pares de iniciadores possui especificidade apenas para cepas de *K. pneumoniae*, sendo possível amplificação de outras bactérias (figuras 3).

A normalização dos dados de qPCR com um gene de referência mal selecionado pode alterar dramaticamente os resultados finais, na medida em que conclusões opostas podem ser obtidas quando comparados com resultados com normalização com genes de referência estáveis. Muitos laboratórios que executam qPCR regularmente só têm amostras normalizadas para um único gene de referência não validado usados para todos os projetos qPCR ao longo de muitos anos. Alguns estudos evidenciam que não existe um gene de referência único para ser utilizado sob as mais variadas condições entre diferentes tecidos. Por isso, a lista de potenciais genes de referência tem sido cada vez mais escolhida a partir de publicações referentes às ferramentas GeNorm e NormFinder para a estabilidade do gene de referência e deve ser validado para cada estudo, com suas condições particulares. Dentre os benefícios de seguir as

A)

```
>MH106400.1 Serratia sp. strain 13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 151
Forward primer 1 ATGACCAGCCACACTGGAAC 20
Template 297 .....T..... 316

Reverse primer 1 CTTCTCCCCGCTGAAAGTG 20
Template 447 .....T..... 428

>MH106399.1 Serratia sp. strain 12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 151
Forward primer 1 ATGACCAGCCACACTGGAAC 20
Template 298 .....T..... 317

Reverse primer 1 CTTCTCCCCGCTGAAAGTG 20
Template 448 .....T..... 429

>MH106398.1 Serratia sp. strain 11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

product length = 151
Forward primer 1 ATGACCAGCCACACTGGAAC 20
Template 298 .....T..... 317

Reverse primer 1 CTTCTCCCCGCTGAAAGTG 20
Template 448 .....T..... 429

>MH106397.1 Serratia sp. strain 10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
```

B)

```
>CP027108.1 Cronobacter sakazakii strain CS-931 plasmid pCsaCS931a, complete sequence

product length = 121
Forward primer 1 AACCTGAAGTGGGACGAAGT 20
Template 3723307 .....T..... 3723326

Reverse primer 1 GGCCAGTCAGAAGCACTTTT 20
Template 3723427 .....A..... 3723408

>CP027107.1 Cronobacter sakazakii strain CS-931 chromosome, complete genome

product length = 121
Forward primer 1 AACCTGAAGTGGGACGAAGT 20
Template 3723325 .....T..... 3723344

Reverse primer 1 GGCCAGTCAGAAGCACTTTT 20
Template 3723445 .....A..... 3723426

>CP027109.1 Cronobacter sakazakii strain CS-09 chromosome, complete genome

product length = 121
Forward primer 1 AACCTGAAGTGGGACGAAGT 20
Template 1510737 .....T..... 1510718

Reverse primer 1 GGCCAGTCAGAAGCACTTTT 20
Template 1510617 .....A..... 1510636
```

C)

```
>CP026975.1 Enterobacter cloacae complex sp. strain FDAARGOS_77 chromosome, complete genome

product length = 97
Forward primer 1 GAAGCGGTAAACAAAGGTCA 20
Template 2833393 .....T..... 2833412

Reverse primer 1 TACACATGGTGAACGGATG 20
Template 2833489 .....G..... 2833470

>CP026047.1 Raoultella planticola strain FDAARGOS_64 chromosome, complete genome

product length = 97
Features associated with this product:
  two-component system response regulator BaeR
  glutamate--ammonia ligase

Forward primer 1 GAAGCGGTAAACAAAGGTCA 20
Template 1790035 .....T..... 1790016

Reverse primer 1 TACACATGGTGAACGGATG 20
Template 1789939 .....G..... 1789958

>CP017990.1 Enterobacter cloacae complex sp. ECNIH7, complete genome

product length = 97
Features associated with this product:
  type I glutamate--ammonia ligase

Forward primer 1 GAAGCGGTAAACAAAGGTCA 20
Template 5124442 .....T..... 5124461

Reverse primer 1 TACACATGGTGAACGGATG 20
```

D)

```
>CP029646.1 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi strain 311189_217186 chromosome, complete genome

product length = 97
Forward primer 1 TATTCTGGTTCACGCAACA 20
Template 3553409 .....C..... 3553390

Reverse primer 1 GGATACAACGGAACGCACTT 20
Template 3553313 .....T..... 3553332

>CP029958.1 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi strain 311189_201186 chromosome, complete genome

product length = 97
Forward primer 1 TATTCTGGTTCACGCAACA 20
Template 3555095 .....C..... 3555076

Reverse primer 1 GGATACAACGGAACGCACTT 20
Template 3554999 .....T..... 3555018

>CP029925.1 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi strain 311189_218186 chromosome, complete genome

product length = 97
Forward primer 1 TATTCTGGTTCACGCAACA 20
Template 3557044 .....C..... 3557025

Reverse primer 1 GGATACAACGGAACGCACTT 20
Template 3556948 .....T..... 3556967

>CP029846.1 Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhi strain 343078_273110 chromosome, complete genome

product length = 97
Forward primer 1 TATTCTGGTTCACGCAACA 20
```

Figura 3 Análise da especificidade do iniciadores através do *Primer-Blast*: A) *16S* de Peng et al., 2018 e Su et al., 2018; B) *gapA* de de Fonseca; Freitas; Vicente, 2011; C) *glnA* de Gomes et al., 2018 e D) *rpoC* de Gomes et al., 2018 Fonte: Autor

diretrizes propostas no *MIQE* está a possibilidade de obtenção de resultados robustos, confiáveis e reprodutíveis no estudo da expressão gênica (GUTIERREZ et al., 2008; KUBISTA et al., 2006; TAYLOR; MRKUSICH, 2014).

Dentre os genes referentes aos quatro pares de iniciadores, *gapA* e *16S* não tem informações sobre a estabilidade deles nos estudos dos quais foram retirados. Já o *glnA* e *rpoC* dentro do estudo do qual foi tirado não se encontram dentre os genes mais estáveis no final de todas as análises. A análise *in silico* não garante a boa reprodutibilidade e a total eficácia quando aplicado em pesquisas *in vivo*. Com isso, mais estudos são necessários, que abranja um número maior de artigos acoplados em outros bancos de dados, além do Pubmed, para avaliar iniciadores e identificar os que estejam dentro do padrões recomendados, que sejam espécie-específico abrangendo todas as STs já descritas de *Klebsiella pneumoniae*, ou um estudo com o objetivo de desenhar esses iniciadores, iniciando assim o desenvolvimento de um banco de iniciadores de genes de *K. pneumoniae*.

7. CONCLUSÃO

- O fluoróforo SYBR[®] Green é muito utilizado em pesquisas que utilizam a técnica de qPCR em estudos de expressão gênica;
- Dentre os trabalhos analisados, poucos não informaram as sequências de iniciadores de genes de referência em estudos com *K. pneumoniae* através de qPCR utilizando SYBR[®] Green.
- Os genes de referência mais comumente utilizados para normalização em estudos com *K. pneumoniae* através de qPCR foram *16S* e *rpoB*.
- Apenas quatro pares de iniciadores estão dentro das normas estabelecidas como ideais, sendo os melhores a serem utilizados em pesquisas posteriores mesmo não sendo espécie específicos, porém devem ser validados individualmente para verificar sua eficácia dentro do estudo.
- Não foi possível a criação do banco de dados com as informações obtidas ao longo do estudo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS-SAPPER, S. et al. Rapid Induction of High-Level Carbapenem Resistance in Heteroresistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p. 3281–3289, jun. 2015.

AH, Y.-M.; KIM, A.-J.; LEE, J.-Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 1, p. 8–15, jul. 2014.

AHN, C. et al. The Resistance Mechanism and Clonal Distribution of Tigecycline-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Korea. **Yonsei Medical Journal**, v. 57, n. 3, p. 641, 2016.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 1 ago. 2004.

ANVISA. **Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016**: Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. Brasil: [s.n.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Boletim+Segurança+do+Paciente+e+Qualidade+em+Serviços+de+Saúde+nº+16+-+Avaliação+dos+indicadores+nacionais+das+Infecções+Relacionadas+à+Assistência+à+Saúde+%28IRAS%29+e+Resistência+microbiana+do+ano+de+2016+%28REVISADO%29/e8ec4ea2-1832-489d-8354-0dbc7e3c2f7b>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Real Time PCR Handbook**, 2016. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1503-PJ9169-CO019861-Update-qPCR-Handbook-branding-Americas-FLR.pdf>>. Acesso em: 16 ago. 2018

AZIMI, L. et al. Tracing of false negative results in phenotypic methods for identification of carbapenemase by Real-time PCR. **Gene**, v. 576, n. 1, p. 166–170, jan. 2016.

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, dez. 2016.

BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23–39, 1 ago. 2002.

BUSTIN, S. A. Real-Time PCR. p. 1117–1125, 2005.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

CAIN, A. K. et al. Morphological, genomic and transcriptomic responses of *Klebsiella pneumoniae* to the last-line antibiotic colistin. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, dez. 2018.

CAMPOS, C. B.; AEPFELBACHER, M.; HENTSCHKE, M. Molecular analysis of the ramRA locus in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to tigecycline. p. 4, 2017.

CANNATELLI, A. et al. *In Vivo* Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* Regulator. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 11, p. 5521–5526, nov. 2013.

CHENG, Y.-H. et al. Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3709–3716, jun. 2016.

CHIU, S.-K. et al. Tigecycline resistance among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Clinical characteristics and expression levels of efflux pump genes. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175140, 7 abr. 2017.

CHOI, M.-J.; KIM, S.; KO, K. S. Pathways Regulating the *pbgP* Operon and Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 1620–1628, 28 set. 2016.

CLIFFORD, R. J. et al. Detection of Bacterial 16S rRNA and Identification of Four Clinically Important Bacteria by Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48558, 6 nov. 2012.

DA FONSECA, E. L.; FREITAS, F. D. S.; VICENTE, A. C. P. Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 797–801, 1 abr. 2011.

DE MAJUMDAR, S. et al. Molecular basis of non-mutational derepression of *ramA* in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2681–2689, 1 out. 2014.

DORAK, M. T. **Real-time PCR**. [s.l.: s.n.].

DU, Z. et al. Emergence and characterization of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples of patients in intensive care units in northern China. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 751–759, 1 ago. 2016.

DZIDIC, S. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. p. 11, 2008.

FALAGAS, M. E.; RAFAILIDIS, P. I.; MATTHAIU, D. K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 13, n. 4–5, p. 132–138, ago. 2010.

GHEDIRA, R. et al. Assessment of Primer/Template Mismatch Effects on Real-Time PCR Amplification of Target Taxa for GMO Quantification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 20, p. 9370–9377, 28 out. 2009.

GOMES, A. É. I. et al. Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, dez. 2018.

GUNN, J. S. et al. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1171–1182, mar. 1998.

GUTIERREZ, L. et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 609–618, ago. 2008.

HE, F. et al. Tigecycline Susceptibility and the Role of Efflux Pumps in Tigecycline Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119064, 3 mar. 2015.

HSIEH, P. et al. CadC Regulates *cad* and *tdc* Operons in Response to Gastrointestinal Stresses and Enhances Intestinal Colonization of *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 1, p. 52–64, jul. 2010.

HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes & Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279–284, jun. 2005.

KIM, S. J.; KO, K. S. Diverse genetic alterations responsible for post-exposure colistin resistance in populations of the same strain of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 3, p. 425–429, set. 2018.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2–3, p. 95–125, abr. 2006.

LING, D.; SALVATERRA, P. M. Robust RT-qPCR Data Normalization: Validation and Selection of Internal Reference Genes during Post-Experimental Data Analysis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17762, 15 mar. 2011.

LIU, L. et al. Differential CTX-M Expression from a Conserved Promoter: Role of Promoter-Associated Spacer Sequences Downstream of the *bla*_{CTX-M} Regulon. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 284–290, 2016.

LUO, M. et al. The KP1_4563 gene is regulated by the cAMP receptor protein and controls type 3 fimbrial function in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **PLOS ONE**, v. 12, n. 7, p. e0180666, 21 jul. 2017.

MACNAIR, C. R. et al. Overcoming *mcr-1* mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, dez. 2018.

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 24–31, fev. 2011.

NAPARSTEK, L. et al. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Hospital Infection**, v. 81, n. 1, p. 15–19, maio 2012.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252–275, 1 maio 2017.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 26 nov. 2014.

PATTYN, F. RTPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 1, p. 122–123, 1 jan. 2003.

PATTYN, F. RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database, major update 2006. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D684–D688, 1 jan. 2006.

PENG, D. et al. Transcriptional regulation of galF by RcsAB affects capsular polysaccharide formation in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **Microbiological Research**, v. 216, p. 70–78, nov. 2018.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **CLIN. MICROBIOL. REV.**, v. 11, p. 15, 1998.

POIREL, L. et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1* / *mcr-2* genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 1, p. 7–10, jan. 2018.

PONCHEL, F. et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnology**, p. 13, 2003.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. **Identification of Enterobacteriaceae** Standards Unit, Microbiology Services, PHE, , 13 abr. 2015. Disponível em: <<https://www.gov.uk/government/collections/standards-for-microbiology-investigations-smi>>. Acesso em: 25 maio. 2018

ROCHA, D. J. P. DA. **DESENHO E VALIDAÇÃO DE UM CONJUNTO DE PRIMERS UNIVERSAIS BACTERIANOS PARA NORMALIZAÇÃO DE ENSAIOS DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL**. [s.l: s.n.].

RODRIGUEZ-MARTINEZ, J. M. et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 68–73, 2012.

ROY, S. et al. Tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* causing neonatal septicaemia (2007–10) and role of an efflux pump in tigecycline non-susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 5, p. 1036–1042, maio 2013.

SAVLI, H. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 403–408, 1 maio 2003.

SIPOS, R. et al. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis: PCR parameters influencing quantitative bias. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 60, n. 2, p. 341–350, maio 2007.

SIU, L. K. et al. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 881–887, nov. 2012.

SRINIVASAN, V. B. et al. Role of the Two Component Signal Transduction System CpxAR in Conferring Cefepime and Chloramphenicol Resistance in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e33777, 4 abr. 2012.

STORM, D. R.; ROSENTHAL, K. S.; SWANSON, P. E. Polymyxin and Related Peptide Antibiotics. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 723–763, jun. 1977.

SU, K. et al. Genome-wide identification of genes regulated by RcsA, RcsB, and RcsAB phosphorelay regulators in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **Microbial Pathogenesis**, v. 123, p. 36–41, out. 2018.

SVEC, D. et al. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 3, p. 9–16, mar. 2015.

TAYLOR, S. C.; MRKUSICH, E. M. The State of RT-Quantitative PCR: Firsthand Observations of Implementation of Minimum Information for the Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE). **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 46–52, 2014.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, n. 2–3, p. 291–295, out. 1999.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145–154, mar. 2011.

VAN LAAR, T. A. et al. Sublethal Concentrations of Carbapenems Alter Cell Morphology and Genomic Expression of *Klebsiella pneumoniae* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1707–1717, mar. 2015.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. p. 12, 2002.

VELEBA, M. et al. Characterization of RarA, a Novel AraC Family Multidrug Resistance Regulator in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4450–4458, ago. 2012.

VERA-LEIVA, A. et al. The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 73–76, mar. 2018.

VUOTTO, C. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 1003–1018, out. 2017.

WANG, L.; GU, H.; LU, X. A rapid low-cost real-time PCR for the detection of *klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 1, p. 9, 2012a.

WANG, L.; GU, H.; LU, X. Rapid low-cost detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes by internally controlled real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 3, p. 361–363, dez. 2012b.

WHILEY, D. M.; SLOOTS, T. P. Sequence variation in primer targets affects the accuracy of viral quantitative PCR. **Journal of Clinical Virology**, v. 34, n. 2, p. 104–107, out. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (ED.). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014.

WU, C.-C. et al. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 1983–1992, 1 jul. 2010.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

YUHAN, Y. et al. Over expression of AdeABC and AcrAB-TolC efflux systems confers tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 165–171, abr. 2016.

ZULFIQAR, S.; SHAKOORI, A. R. Molecular characterization, metal uptake and copper induced transcriptional activation of efflux determinants in copper resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Gene**, v. 510, n. 1, p. 32–38, nov. 2012.

9. APÊNDICE A

	Sequência de primers	gene amplificado	Autor/ Ano	Tamanho do fragmento (> 60 e < 200)	Tamanh o do primer (>18 e < 28)	Tm (diferença entre o par < 1°C)	Conteúdo GC (ideal ≈50%: >30% e < 80%)	Complement aridade 3' (>2.00)	Específic o apenas para <i>Klebsiella pneumoni ae</i>
F	GATTGCCGATATCGTCTTCG	<i>proC</i>		99	20	56,60	50	3.00	
R	GAGACCACCAGCGACTCTTT				20	59,68	55	1.00	
F	GAAGGCGGTAACAAAGGTCA	<i>glnA</i>		97	20	58,11	50	1.00	Não
R	TACACATGGTGGAACGGATG				20	57,61	50	1.00	
F	GTGACCCGTCGTACGATTTT	<i>gyrA</i>		99	20	58,30	50	0.00	
R	GATAATCGGGTCGATGTTGG				20	56,10	50	0.00	
F	TTAAACAGGCCGAATTCCAG	<i>recA</i>		99	20	56,03	45	2.00	
R	CCGCTTTCTCAATCAGCTTC				20	57,18	50	1.00	
F	TCCGGTGCATATGATTGAGA	<i>rpoD</i>		105	20	56,41	45	2.00	
R	ATACGCTCAGCCAGCTCTTC				20	59,90	55	0.00	
F	AACTACGACAAGCCGGAAAA	<i>rho</i>	GOMES et al., 2018	99	20	57,76	45	0.00	
R	ACCGTTACCACGCTCCATAC				20	59,83	55	0.00	
F	TATTCTGGTTCCACGCAACA	<i>rpoC</i>		97	20	57,45	45	2.00	Não
R	GGATACAACGGAACGCACTT				20	58,56	50	0.00	
F	GACGATCCCTAGCTGGTCTG	<i>rrsH</i>		95	20	59,33	60	1.00	
R	GTGCAATATTCCCCACTGCT				20	58,23	50	0.00	
F	CTGGATAACCAGCAGTATCGT TC	<i>aat</i>		106	23	58,95	47,83	0.00	
R	GTACATTCCACCTACCAGCGT ATT				24	60,44	45,83	1.00	
F	GCTAAGCCGGAAATCATCAA	<i>ffh</i>		104	20	56,19	45	0.00	
R	ATGTCGTCGAACTGCTTGAG				20	58,30	50	2.00	
F	GCCACTGTAAGGCGCTACTC	<i>trpS</i>		100	20	60,81	60	0.00	

Sequência de primers		gene amplificado	Autor/ Ano	Tamanho do fragmento (> 60 e < 200)	Tamanho do primer (>18 e < 28)	Tm (diferença entre o par < 1°C)	Conteúdo GC (ideal ≈50%: >30% e < 80%)	Complement aridade 3' (>2.00)	Específico apenas para <i>Klebsiella pneumoni ae</i>
F	AGGCGATGAAGGACGTGCTA	23S	CHENG et al., 2016	76	20	61,32	55	4.00	
R	TTCGGACATCGCCGGTTATA				20	58,97	50	4.00	
F	CGCGTATGTCCGATCGAAA	rpoB	CHOI; KIM; KO, 2016	100	19	58,14	52,63	4.00	
R	GCGTCTCAAGGAAGCCATATT C				20	59,45	50	0.00	
F	CGAAACCGCTCGTAAACACA	gapA	AHN et al., 2016	140	20	59,15	50	0.00	
R	AGGAAGCGTTGGAAACGATG				20	58,84	50	3.00	
F	TTGACGTTACCCGCAGAAGAA	rrsE	DU et al., 2016	71	21	59,93	47,62	0.00	
R	GCTTGCACCCTCCGTATTACC				21	61,08	57,14	3.00	
F	GTCATCATGGCCCTTACGAG	rrsE	YUHAN et al., 2016	SEM AMPLIFICAÇÃO					
R	ACTTTATGAGGTCCGCTTGCT								
F	Não informado	rpoB	ADAMS- SAPPER et al., 2015						
R									
F	CCGTATCTACGCTGTGCT	rpoB	HE et al., 2015	299					
R	TGTTACCGTGACGACCTG								
F	TACGCGGTATACGACACCAT	gyrA	VAN LAAR et al., 2015	91					
R	CGATGGAACCAAAGTTACCC								
F	GTTACCCGCAGAAGAAGCAC	16S	DE MAJUMDAR et al., 2014	220					
R	CTACGCATTTACCGCTACA								
F	TTGACGTTACCCGCAGAAGAA	rrsE	ROY et al., 2013	71	21	59,93	47,62	0.00	
R	GCTTGCACCCTCCGTATTACC				21	61,08	57,14	3.00	
F	Não informado	rpoB	NAPARSTEK et al., 2012						
R									

Sequência de primers		gene amplificado	Autor/ Ano	Tamanho do fragmento (> 60 e < 200)	Tamanho do primer (>18 e < 28)	Tm (diferença entre o par < 1°C)	Conteúdo GC (ideal ≈50%: >30% e < 80%)	Complement aridade 3' (>2.00)	Específico apenas para <i>Klebsiella pneumoni ae</i>
F	AAGGCGAATCCAGCTTGTTCA GC	<i>rpoB</i>	RODRIGUEZ- MARTINEZ et al., 2012	148	23	64,07	52,17	6.00	Não
R	TGACGTTGCATGTTTCGCACCC ATCA				25	67,60	52	2.00	
F	CAGCCACACTGGAACTGAGA	<i>16S (rrsE)</i>	SRINIVASAN et al., 2012	204					
R	GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG								
F	GTTACCCGCAGAAGAAGCAC	<i>16S</i>	VELEBA et al., 2012	220					
R	CTACGCATTTACCGCTACA								
F	TACGCGGTATACGACACCAT	<i>gyrA</i>	ZULFIQAR; SHAKOORI, 2012	91					
R	CGATGGAACCAAAGTTACCC								
F	AACCTGAAGTGGGACGAAGT	<i>gapA</i>	DA FONSECA; FREITAS; VICENTE, 2011	121	20	58,87	50	1.00	
R	GGCCAGTCAGAACGACTTTT				20	58.41	50	1.00	
F	GGTTAAGCGACTAAGCGTACA CGGT	<i>23S</i>	HSIEH et al., 2010	839 -955					
R	ACGAGGCGCTACCTAAATAGC TTTC								
F	TCCATGAAGTCGGAATCGCTA G	<i>16S</i>	HSIEH et al., 2010	96	22	59,97	50	4.00	
R	CACTCCCATGGTGTGACGG				19	60,38	63,16	1.00	

10. APÊNDICE B

Ano	Nº total de artigos utilizando qPCR	Nº de artigos que utilizaram SYBR® Green na técnica qPCR	Nº de artigos que utilizaram outros fluoróforos	Nº de artigos com estudos de expressão utilizando SYBR® Green	Estudos de expressão utilizando outros fluoróforos	Nº de artigos sem informações para classificar*
2018	13	6	7	4	1	0
2017	9	6	3	4	0	0
2016	17	7	6	6	1	4
2015	9	3	5	3	0	1
2014	8	5	3	1	1	0
2013	11	3	7	1	1	1
2012	17	10	5	5	1	2
2011	10	3	7	1	1	0
2010	3	1	2	1	0	0
2009	4	1	3	1	1	0
2008	3	1	2	0	1	0
2007	3	1	2	0	0	0
2005	2	1	1	0	1	0
2004	2	1	1	0	0	0
2001	1	0	1	0	0	0
Total	112	49	55	27	9	8

*Trabalhos que não informaram ao longo do texto informações do fluoróforo utilizado

11. ANEXO A

Análise feita com os iniciadores através do *Beacon Design* da *Premier Biosoft International*

Name: ***glnA***

Description:

Assay Type: *SYBR® Green*

Reaction Conditions:

Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	Monovalent Concentration (mM)	50
Free Mg ⁺⁺ Concentration (mM)	3	Total Na ⁺ Concentration (mM)	269.09

Sense Primer: GAAGGCGGTAACAAAGGTCA

Length (bp)	T _m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	55.09	50	1	-0.3	<u>0.0</u>	0.0

Anti-sense Primer: TACACATGGTGGAAACGGATG

Length (bp)	T _m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	54.58	50	1	-0.3	<u>-2.3</u>	-1.3

Secondary Structures for Sense Primer

Dimer:-

Not Found

Hairpin:-

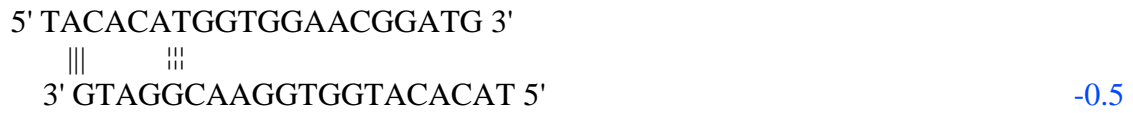
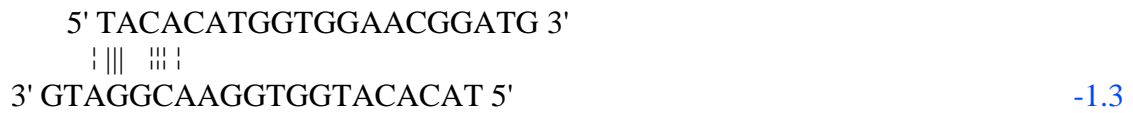
Not Found

Secondary Structures for Anti-sense Primer

Dimer:-

5' TACACATGGTGGAAACGGATG 3'
 ||||
 3' GTAGGCAAGGTGGTACACAT 5'

-2.3

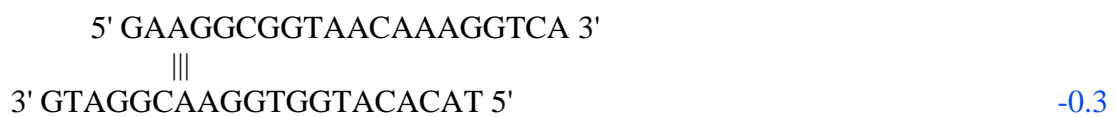


Hairpin:-



Cross Dimer

Cross Dimer between Sense Primer and Anti-sense Primer:-



Name: *rpoC*

Assay Type: SYBR[®] Green

Description:

Reaction Conditions:

Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	Monovalent Concentration (mM)	50
Free Mg ⁺⁺ Concentration (mM)	3	Total Na ⁺ Concentration (mM)	269.09

Sense Primer: TATTCTGGTTCCACGCAACA

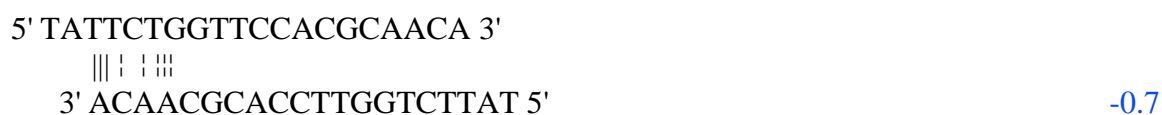
Length (bp)	T _m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	54.41	45	1	-4.2	<u>-1.5</u>	-0.7

Anti-sense Primer: GGATACAACGGAACGCACTT

Length (bp)	T _m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	55.58	50	1	-4.2	<u>0.0</u>	0.0

Secondary Structures for Sense Primer

Dimer:-



Hairpin:-



\CGCAACA 3'

-0.7

Secondary Structures for Anti-sense Primer

Dimer:-

Not Found

Hairpin:-

Not Found

Cross Dimer

Cross Dimer between Sense Primer and Anti-sense Primer:-

5' TATTCTGGTTCCACGCAACA 3'

 | |||| |

3' TTCACGCAAGGCAACATAGG 5'

-4.2

5' TATTCTGGTTCCACGCAACA 3'

 | |||

3' TTCACGCAAGGCAACATAGG 5'

-1.3

5' TATTCTGGTTCCACGCAACA 3'

 | ||| |

3' TTCACGCAAGGCAACATAGG 5'

-0.7

5' TATTCTGGTTCCACGCAACA 3'

 ||| | |

3' TTCACGCAAGGCAACATAGG 5'

-0.6

5' TATTCTGGTTCCACGCAACA 3'

 ||| |

3' TTCACGCAAGGCAACATAGG 5'

0.5

Name: **16S**

Assay Type: SYBR® Green

Description:

Reaction Conditions:

Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	Monovalent Concentration (mM)	50
Free Mg ⁺⁺ Concentration (mM)	3	Total Na ⁺ Concentration (mM)	269.09

Sense Primer: ATGACCAGCCACACTGGAAC

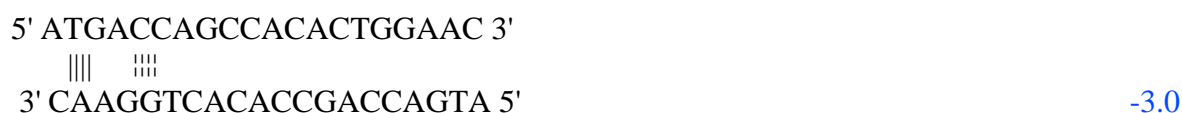
Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	57.18	55	1	-3.5	<u>-3.0</u>	-3.0

Anti-sense Primer: CTCCTCCCCGCTGAAAGTG

Length (bp)	Tm (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	57.65	60	1	-3.5	<u>-0.6</u>	-0.6

Secondary Structures for Sense Primer

Dimer:-



Hairpin:-

/CCGACCAGTA 5'
 A ||||
 \CACTGGAAC 3' -3.0

/CACCGACCAGTA 5'
 A |||
 \CTGGAAC 3' -1.5

Secondary Structures for Anti-sense Primer

Dimer:-

5' CTTCTCCCCGCTGAAAGTG 3'
 ||| | | |||
 3' GTGAAAGTCGCCCTCCTTC 5' -0.6

5' CTTCTCCCCGCTGAAAGTG 3'
 ||| | | | |||
 3' GTGAAAGTCGCCCTCCTTC 5' -0.5

Hairpin:-

/CCTCCTTC 5'
 C | |||
 \CGCTGAAAGTG 3' -0.6

/CCCTCCTTC 5'
 | | | |||
 \CGCTGAAAGTG 3' -0.5

Cross Dimer

Cross Dimer between Sense Primer and Anti-sense Primer:-

5' ATGACCAGCCACACTGGAAC 3'
 | ||| | |

3' GTGAAAGTCGCCCCTCCTTC 5' -3.5

5' ATGACCAGCCACACTGGAAC 3'

$\begin{array}{c} | \quad ||| \\ 3' \text{ GTGAAAGTCGCCCCTCCTTC } 5' \end{array}$
-2.5

5' ATGACCAGCCACACTGGAAC 3'

$\begin{array}{c} ||| \quad | \\ 3' \text{ GTGAAAGTCGCCCCTCCTTC } 5' \end{array}$
-2.5

5' ATGACCAGCCACACTGGAAC 3'

$\begin{array}{c} | \quad || \quad ||| \\ 3' \text{ GTGAAAGTCGCCCCTCCTTC } 5' \end{array}$
-1.3

5' ATGACCAGCCACACTGGAAC 3'

$\begin{array}{c} ||| \quad | \\ 3' \text{ GTGAAAGTCGCCCCTCCTTC } 5' \end{array}$
-1.3

Name: **gapA**

Description:

Assay Type: SYBR[®] Green

Reaction Conditions:

Nucleic Acid Concentration (nM)	0.25	Monovalent Concentration (mM)	50
Free Mg ⁺⁺ Concentration (mM)	3	Total Na ⁺ Concentration (mM)	269.09

Sense Primer: AACCTGAAGTGGGACGAAGT

Length (bp)	T _m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	55.78	50	1	-2.4	<u>0.0</u>	0.0

Anti-sense Primer: GGCCAGTCAGAACGACTTTT

Length (bp)	T _m (°C)	GC%	GC Clamp	Cross Dimer (ΔG)	Self Dimer (ΔG)	Hairpin (ΔG)
20	55.4	50	1	-2.4	<u>-4.4</u>	-2.4

Secondary Structures for Sense Primer

Dimer:-

Not Found

Hairpin:-

Not Found

Secondary Structures for Anti-sense Primer

Dimer:-

5' GGCCAGTCAGAACGACTTTT 3'

|||

3' TTTTCAGCAAGACTGACCGG 5' -4.4

5' GGCCAGTCAGAACGACTTTT 3'

||| |||

3' TTTTCAGCAAGACTGACCGG 5' -2.4

Hairpin:-

/GACTGACCGG 5'

A |||

\ACGACTTTT 3' -2.4

Cross Dimer

Cross Dimer between Sense Primer and Anti-sense Primer:-

5' AACCTGAAGTGGGACGAAGT 3'

||| |

3' TTTTCAGCAAGACTGACCGG 5' -2.4

5' AACCTGAAGTGGGACGAAGT 3'

||| | | |

3' TTTTCAGCAAGACTGACCGG 5' -2.0

5' AACCTGAAGTGGGACGAAGT 3'

|||

3' TTTTCAGCAAGACTGACCGG 5' -2.0

5' AACCTGAAGTGGGACGAAGT 3'

| |||

3' TTTTCAGCAAGACTGACCGG 5' -1.5

5' AACCTGAAGTGGGACGAAGT 3'

|||

3' TTTTCAGCAAGACTGACCGG 5' -1.1

5' AACCTGAAGTGGGACGAAGT 3'

|| | |||

3' TTTTCAGCAAGACTGACCGG 5' -1.1