



DETECÇÃO DE *Streptococcus agalactiae* EM GESTANTES UTILIZANDO A METODOLOGIA DE PCR EM TEMPO REAL

Sarah Kristina Mariani da Costa (PIBIC/Fundação Araucária/UEM), Lincoln Luís Silva, Lucas Rodrigues, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferraciolli, Vera Lucia Dias Siqueira, Rosilene Fressatti Cardoso, Regiane Bertin De Lima Scodro
Orientadora, e-mail: rblscodro@uem.br

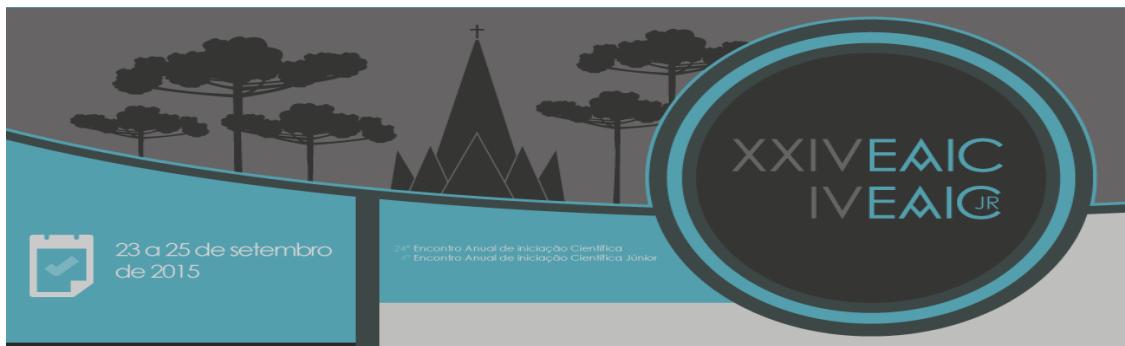
Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá, Paraná, Brasil.

Microbiologia – Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, PCR em tempo real, EGB.

Resumo:

Streptococcus agalactiae (estreptococos do grupo B, EGB) são bactérias que colonizam a vagina e o reto e tem importantes implicações nas mulheres grávidas e nos recém-nascidos. A triagem para EGB na vagina e no reto em mulheres grávidas entre 35 e 37 semanas de gestação, é recomendada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* e a administração da quimioprofilaxia intraparto em mulheres colonizadas é a triagem mais eficaz e recomendada para prevenir a infecção precoce neonatal pelo EGB. A cultura é o método padrão-ouro para o diagnóstico da colonização de EGB, no entanto, este método exige pelo menos 48 horas para a liberação do resultado. Atualmente, ensaios baseados em biologia molecular, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são uma importante ferramenta usada na detecção da colonização de EGB em mulheres grávidas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi detectar *S. agalactiae* em secreções (swabs) vaginais de gestantes por PCR em tempo real (qPCR). Foram analisadas 197 amostras de gestantes, pertencentes à 18ª Regional de Saúde do Estado do Paraná e comparados à cultura bacteriana. Através da cultura bacteriana, observou-se a presença de EGB em 50 (25,4 %) gestantes, já pelo método da qPCR, 82 (41,6 %) pacientes foram consideradas positivas ($p<0,05$). A partir desses resultados, concluiu-se que a utilização da técnica qPCR é bastante sensível e que este método pode ser aplicado para a detecção mais rápida de EGB em gestantes.



Introdução

Streptococcus agalactiae (estreptococos do grupo B, EGB) é uma bactéria comensal que coloniza a vagina e o reto e tem importantes implicações para as mulheres grávidas no parto prematuro, infecção de urina, corioamnionite, endometrite pós-parto, entre outros (MELCHOR et al., 2002). No recém-nascido, a infecção pelo micro-organismo se caracteriza primariamente por sepse e pneumonia ou, mais raramente, meningite. A triagem para EGB na vagina e no reto em mulheres grávidas entre a 35^a e 37^a semanas de gestação é recomendada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). As gestantes colonizadas são geralmente assintomáticas e a taxa de colonização materna por EGB varia de 10 a 40% e é a causa mais comum de parto prematuro e sepse neonatal em países desenvolvidos (CHURCH et al., 2008). O método padrão para o diagnóstico da colonização de EGB consiste da cultura bacteriana vaginal e retal. Atualmente, ensaios baseados em biologia molecular, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), são importantes ferramentas usadas na detecção da colonização de EGB em mulheres grávidas (BERGH et al., 2004). Sendo assim, o objetivo desse estudo é detectar *S. agalactiae* em secreção vaginal de gestantes, utilizando PCR em tempo real (qPCR) e com isso no futuro, agilizar e melhorar o diagnóstico laboratorial destas pacientes.

Materiais e métodos

Coleta das amostras

Um swab vaginal foi inoculado em eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de água MilliQ® estéril. Estas amostras foram mantidas a -20 °C. A pesquisa de EGB pelo método padrão (cultura e enriquecimento em meio seletivo), já foi realizada nestas pacientes e estes resultados foram comparados ao qPCR. A pesquisa foi previamente submetida à análise do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá (UEM) com parecer favorável nº 236/2011.

Extração do DNA de cepas bacterianas

O DNA de *S. agalactiae* ATCC 13813, das amostras clínicas e da amostra humana foram extraídos utilizando fervura e o kit de extração QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) (De PARIS et al., 2011).



Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

Para a qPCR foram escolhidos os iniciadores e sondas listados na tabela 1 (BERGSENG et al., 2007). A reação de amplificação utilizando kit TaqMan (Invitrogen) foi realizada no equipamento Applied Biosystems StepOne™ nas seguintes condições: Um ciclo de 2 minutos a 50 °C e desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 56 °C e 1 minuto a 60°C. Os resultados obtidos com as diferentes metodologias foram analisados pelo teste McNemar usando o software BioStata 5.3.

Tabela 1 - Sequência de iniciadores e sondas utilizados para detecção de *Streptococcus agalactiae* por PCR em tempo real.

Gene alvo	Sequências de iniciadores e sonda (5'→3')
<i>sip</i>	Iniciador 1: ATCCTGAGA CAACACTGACA Iniciador 2: TTGCTGGTG TTTCTATTTCA Sonda 1: 6-FAM-ATC AGA AGA GTC ATA CTG CCA CTT C-MGB
DNA humano	Iniciador 3: GTC ATA GGT AGT TGT GGT CG Iniciador 4: CAT AGA CTC ACC CTA GCA TGG Sonda 2: VIC-CAC TGA GCC TCT CTC TATCC-MGB

Resultados e Discussão

Foram analisados 197 swabs vaginais de gestantes, destas, todas foram submetidas à técnica de qPCR e cultura bacteriana em meios de cultura específicos. Através da cultura bacteriana, observou-se a presença de EGB em 50 (25,4 %) gestantes, já pelo método da qPCR, 82 (41,6 %) pacientes foram consideradas positivas (Tabela 2). Esta diferença é estatisticamente significativa ($p<0,05$), já que a qPCR demonstrou 64 % de detecção superior à cultura, o que representa um aumento de positividade em 32 amostras vaginais de gestante. Isto está de acordo com trabalhos anteriores, que também relatam a maior positividade quando se usa a ferramenta molecular (BERSENG et al., 2007; BERGH, et al., 2004).

Conclusões

A partir desses resultados, concluiu-se que a utilização da técnica de qPCR é bastante sensível e que este método pode ser aplicado para a detecção mais rápida de EGB em gestantes.



Tabela 2. Comparação entre cultura bacteriana e PCR em tempo real (qPCR) na detecção de *Streptococcus agalactiae* em swabs vaginais de gestantes.

	Resultados		<i>p</i> -valor
	Positivos	Negativos	
Cultura	50 (25,4)	147 (74,6)	0.0002
qPCR	82 (41,6)	115 (58,4)	

Agradecimentos

Fundação Araucária.

Referências

BERGH, K. et al. Detection of group B streptococci (GBS) in vaginal swabs using real-time PCR with TaqMan probe hybridization. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 221-223, 2004.

BERGSENG, H. et al. Real-time PCR targeting the *sip* gene for detection of group B *Streptococcus* colonization in pregnant women at delivery. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 223-228, 2007.

CHURCH, D. L. et al. Evaluation of StrepB carrot broth versus Lim broth for detection of group B *Streptococcus* colonization status of near-term pregnant women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2780-2782, 2008.

DE-PARIS, F. et al. Group B *Streptococcus* detection: comparison of PCR assay and culture as a screening method for pregnant women. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 323-327, 2011.

MELCHOR, J. C. et al. Estrategias para la profilaxis de la sepsis neonatal por estreptococo grupo B. **Actualidad Obstétrico Ginecología**, v. 14, p. 41-44, 2002.