



ESTUDO COMPARATIVO DOS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *Streptococcus agalactiae* DA REGIÃO ANORRETAL DE GESTANTES

Lincoln Luís Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Katiany Rizzieri Caleffi-Ferraciolli, Rubia Andreia Falleiros de Pádua, Vera Lucia Dias Siqueira, Rosilene Fressatti Cardoso, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora), e-mail: lincolnluis07@gmail.com

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

Microbiologia – Microbiologia Aplicada

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

Resumo:

Streptococcus agalactiae (EGB) é um coco Gram positivo encontrado na microbiota vaginal e no gastrointestinal de seres humanos. Os recém-nascidos podem se contaminar durante o parto e desenvolver quadros clínicos severos como meningite, septicemia e/ou pneumonia. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) recomenda a detecção do EGB a partir da 35ª semana gestacional através de meios de cultura (padrão-ouro). Todavia, esse método convencional requer até 72 horas para confirmar a identificação, tempo precioso para a gestante e a criança. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi comparar os métodos de detecção de EGB pelos meios de cultura convencionais e molecular. **Material e método:** Para detecção de EGB, foram realizadas sementeiras de swabs anorretais em ágar sangue e em meios de enriquecimento (Todd-Hewitt e HPTH). Outra coleta foi realizada para a reação em cadeia da polimerase em tempo real. Participaram do estudo gestantes atendidas pela 18ª Regional de Saúde do Estado do Paraná. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, parecer 236/2011. **Resultados e Discussão:** Foram analisadas 55 amostras, destas 25 (45,5 %) foram positivas pela cultura bacteriana e 41 (74,5 %) pela PCR ($p < 0,05$) com sensibilidade superior à 90 %. **Conclusão:** concluiu-se que a detecção pela qPCR é superior ao método convencional e pode tornar-se numa poderosa ferramenta para detectar EGB de forma mais rápida.





Introdução

Streptococcus agalactiae, (Estreptococos do grupo B/EGB), é uma bactéria frequentemente encontrada na microbiota de mulheres, colonizando o trato genital a partir do trato gastrointestinal e também, raramente, o urinário. Estima-se que de 15 a 40 % das mulheres grávidas apresentam colonização no trato genital e cerca de 3 % no reto; e provável que 50 a 75 % dos recém-nascidos expostos a essa bactéria são colonizados ainda na vida intrauterina (pelo rompimento das membranas) ou depois do parto o qual caracteriza uma transmissão vertical (Função e Narchi, 2013). Nos últimos anos, estudos apontam que a colonização materna com EGB é reconhecida como a causa mais frequente de infecção grave em recém-nascidos. Os neonatos contaminados por essa bactéria nas primeiras 24 horas de vida se destacam pelos altos índices de morbidade e mortalidade em decorrência da pneumonia, meningite e/ou septicemia.

Para a identificação do EGB através dos meios de culturas, são utilizados meios específicos como Hitchens-Pike-Todd-Hewitt (HTPH) e ágar sangue. Esse método requer no mínimo 72 h para confirmar a presença ou não dessa bactéria no paciente. Ensaio baseado em biologia molecular, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido empregada na pesquisa para detecção de EGB em mulheres grávidas em poucas horas. Nesses pacientes, o tempo de detecção pode determinar a qualidade de vida do feto, pois uma infecção ainda na vida intrauterina pode deixar sequelas ou até mesmo a morte do recém-nascido.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo de metodologias para detecção de EGB a partir de amostras anorretais isoladas de gestantes.

Materiais e métodos

Extração de DNA: O DNA de *S. agalactiae* ATCC 13813 (controle positivo para EGB), o material do swab da região anorretal de uma doadora voluntária (conhecidamente negativa para EGB/controlado positivo humano) e as amostras de swab das pacientes foram extraídos utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). O DNA foi armazenado a -20 °C.

Seleção do gene alvo, primers e sonda: Os primers (iniciadores) e sonda específica para *S. agalactiae* e DNA humano foram selecionados baseados em estudos prévios (Bergseng *et al.*, 2007).





O gene alvo da bactéria selecionado foi o *sip* (GenBank: AF15135), tendo como iniciadores: primer 1: ATC CTG AGA CAA CACT GACA (posição 263–282) e primer 2: TTG CTG GTG TTT CTA TTT TCA (posição 340–320). A sonda utilizada foi TaqMan™ probe: 6-FAM–ATC AGA AGA GTC ATA CTG CCA CTTC–MGB (posição 293–317).

Para o gene alvo humano foi escolhido o Humano DNA (AL 133466), tendo como primer 1: GTC ATA GGT AGT TGT GGT CG (posição 10 4242–10 4223) e primer 2: CAT AGA CTC ACC CTA GCA TGG (posição 10 4006–10 4026). A sonda utilizada foi a TaqMan™ probe: VIC–CAC TGA GCC TCT CTC TAT CC–MGB (posição 10 4090–10 4071).

Resultados e Discussão

Foram analisados 55 swabs anorretais de gestantes, destas, todas foram submetidas à técnica de qPCR e cultura bacteriana em meios de cultura específicos. Na figura 1, foi observado que cada meio de cultura tem seu próprio poder de detecção e limitação. O EGB foi detectado com maior frequência no AS, no entanto, outras colônias somente cresceram no HPTH, isso demonstra a necessidade de se haver mais de um meio de cultura para a identificação do EGB. Vale salientar que o meio TODD não recuperou isoladamente o EGB.

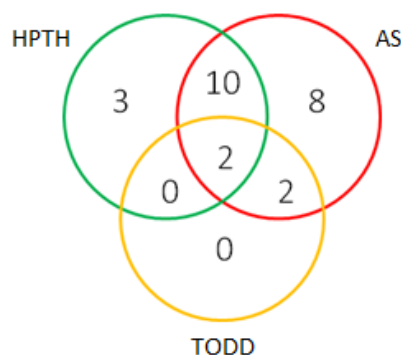


Figura 1. Dispersão do número de isolados de *Streptococcus agalactiae* nos meios de cultura.





Tabela 1. Comparativo entre cultura e qPCR de *Streptococcus agalactiae*.

		Cultura		
		Positivo	Negativo	Total
qPCR	Positivo	25*	16	41*
	Negativo	0	14	14
	Total	25	30	55
Sensibilidade		>99%		
*p-valor		0,0001		

Considerando o resultado dos três meios de cultura, a cultura bacteriana detectou EGB em 25 (45,5 %) gestantes, já pelo método da qPCR, 41 (74,5 %) pacientes foram positivas. Esta diferença é estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e isso se deve pelo poder de detecção superior no método molecular o qual positivou 64 % a mais em relação ao método convencional (Tabela 1).

Conclusões

Com esses resultados, concluiu-se que a utilização da técnica de qPCR é uma poderosa ferramenta para a detecção do *Streptococcus agalactiae* pelo qual as gestantes poderiam se beneficiar com diagnóstico rápido e seguro pois assim medidas profiláticas poderiam ser adotadas mais precocemente.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Maringá e ao Departamento de Análises Clínicas (DAB/UEM).

Referências

BERGSENG, H. et al. - Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B Streptococcus. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 2, p. 223-8, 2007.

FUNÇÃO, J. M.; NARCHI, N. Z. Pesquisa do estreptococo do Grupo B em gestantes da Zona Leste de São Paulo. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 47, p. 22-29, 2013.

