

VERIFICAÇÃO DA EFICÁCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) NO RASTREAMENTO DO ESTREPTOCOCO DO GRUPO B (EGB), EM GESTANTES ATENDIDAS NA MATERNIDADE BALBINA MESTRINHO, MANAUS/AM.

Flávia da Costa MOURÃO; Julia Ignez SALEM; Carlos Henrique Esteves FREIRE; Patricia Orlandi Puccinelli NOGUEIRA;
Bolsista PIBIC/CNPQ; Orientadora INPA/CSAS; Co-orientador UFAM; Colaboradora FIOCRUZ.

1.Introdução

O Estreptococo do Grupo B (EGB) tem relevância durante a gravidez e o puerpério por ter sido responsável pelo surgimento de quadros infecciosos graves em recém natos. Schuchat et al. (2000) em um estudo multicêntrico com 52.406 nascimentos o EGB foi o agente mais prevalente, sendo encontrado em mais de 40% dos casos. A colonização materna pelo EGB é estimada mundialmente entre 4% e 30% (DILLON et al., 1982; BAKER;EDWARDS, 1990; HICKMAN et al., 1999; MOYO et al., 2000). Alguns estudos brasileiros revelam que o EGB também é um dos organismos mais frequentemente isolado em infecções neonatais precoces (MIURA; MARTIN, 2001; VACILOTO et al., 2002; BERALDO et al., 2004, POGERE et al., 2005; NOMURA et al., 2009) e a importância de sua detecção em espécimes clínicos de mulheres grávidas tem relação com o diagnóstico e a terapêutica adequada, tanto da grávida como de seu recém nato (SCHRAG et al., 2002). Um estudo realizado no Amazonas por Pinheiro et al. (2007) relata a presença da sepse neonatal precoce em 5,3% dos casos estudados, sem identificar o percentual de gestantes colonizadas pelo EGB. Infelizmente na rede básica de saúde não se dispõe de estratégias para o rastreamento do EGB em gestantes brasileiras. Constata-se que no mais recente Manual Técnico de Pré Natal e Puerpério inexistente um protocolo direcionado a detecção, prevenção e tratamento da infecção neonatal pelo EGB (BRASIL, 2006). Assim, a sociedade médica segue o protocolo estabelecido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), dos Estados Unidos da América do Norte (EUA), em cujo último protocolo tem-se a inclusão do teste de Amplificação de Ácidos Nucléicos (NAAT), utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), nas técnicas laboratoriais de pesquisa do EGB. Os dados existentes ainda são escassos, porém, indicam que quando o NAAT/PCR é realizado diretamente da amostra clínica coletada tem percentuais de positividade entre 62,5% e 98,5% (AZIZ et al., 2005; ATKINS et al., 2006; GAVINO; WANG, 2007; EDWARDS et al., 2008, EL HELALI et al., 2009, ALFA et al., 2010). Quando executado a partir de alíquota de caldo enriquecido onde a amostra clínica foi imersa, os percentuais de positividade variam de 92,5% a 100% (GOODRICH; MILLER, 2007; BLOCK et al., 2008; SCICCHITANO; BOURBEAU, 2009). Então, mediante o exposto e com o intuito de verificar a eficácia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional no rastreamento do Estreptococo do Grupo B (EGB) em gestantes atendidas na maternidade Balbina Mestrinho - Manaus/AM, elaborou-se a presente proposta de iniciação científica. Busca-se por meio dela, também, verificar a eficácia da PCR efetuada diretamente da amostra clínica e após submissão em caldo enriquecido. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Amazonas protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº 0263.0.115.115.

2.Material e Métodos

Foram convidadas a participar da pesquisa 76 gestantes que estavam entre a 35ª e 37ª semana de gestação (período indicado pelo CDC, 2010), confirmada pela ultrassonografia e/ou pela data da última menstruação. Dentre estas, foram incluídas as pacientes que não fizeram uso de antibiótico nos últimos 7 dias e/ou realizaram exame ginecológico nas 24 horas antecedentes, e as que aceitaram participar do estudo. Foram excluídas as que desistiram de participar no decorrer do estudo. Foi utilizado formulário para obtenção das informações pessoais, demográficas, história obstétrica pregressa e atividade sexual. Após exame Clínico/Obstétrico realizado por profissional qualificado, foi realizada a coleta de duas amostras clínicas vaginais e duas amostras anorretais, mediante o uso de swabs estéreis, individualmente introduzidos no intróito vaginal até o terço distal da vagina, sem qualquer procedimento de antissepsia prévio e sem a utilização de espéculo. Após suave movimento rotatório, cada swab foi retirado e imediatamente imerso em meio de transporte de Stuart. Os meios foram colocados em geladeira até o transporte ao laboratório (no máximo por 24 horas), onde os swabs foram retirados e procedimentos sequenciais foram realizados. No primeiro deles, pegou-se um dos swab's vaginal e anorretal coletados que, em seguida, foram submetidos à extração de DNA e a reação de PCR foi executada conforme ilustração abaixo:



Apêndice 1 – Ilustração das etapas associadas à técnica de PCR convencional realizadas na Fiocruz/AM. 1. Preparo de solução com tampões, nucleotídeos, primers e enzima Taq; 2. Adição do DNA das amostras; 3. Amplificação do DNA no termociclador; 4. Uso de ladder no pocinho mais à esquerda do gel; 5. Colocação das amostras com azul de bromofenol no gel de agarose; 6. Leitura das sequências encontradas no gel.

Os Swab's restantes foram imersos em caldo de Todd-Hewitt por 6 horas. Posteriormente foi retirada uma alíquota de 200 μ L que foi submetida à extração do DNA e PCR convencional, conforme relatado para o 10^s swab's. Para fins de análise dos resultados, a presença do EGB nas amostras clínicas foi determinada quando o PCR proporcionou uma positividade em qualquer das amostras analisadas. Para as análises de sensibilidade e especificidade dos métodos, assim como seus valores preditivos positivos e negativos. Também foram efetuadas as análises de concordância dos métodos diagnósticos, pelo cálculo de Concordância Observada.

3.Resultados e Discussão

Todas as 76 gestantes participantes tiveram suas amostras analisadas pelo (PCR). Delas, nenhuma apresentou positividade para o EGB. Dois perfis visualizados na tabela abaixo, justificam a negatividade baseando-se em pesquisas já feitas.

Característica analisada	idade					COR		
	≤15 anos	16 a 25 anos	26 a 35 anos	36 a 45 anos	≥ 46 anos	Branca	Negra	Parda
n	5	17	40	13	1	57	16	3
%	6,5	22,3	52,6	17,1	1,3	75	21	4

Tabela 1 – Cor e intervalo de idade mais predominantes entre as gestantes.

Apesar disso, o resultado contraria a maioria dos trabalhos supracitados cuja positividade ficou entre 62,5% e 98,5% quando realizada diretamente da amostra (AZIZ et al., 2005; ATKINS et al., 2006; GAVINO; WANG, 2007; EDWARDS et al., 2008, EL HELALI et al., 2009, ALFA et al., 2010) e entre 92,5% a 100% quando executada a partir de alíquota de caldo enriquecido onde a amostra clínica foi imersa (GOODRICH; MILLER, 2007; BLOCK et al., 2008; SCICCHITANO; BOURBEAU, 2009). Dentre as suposições para a negatividade das amostras estão incluídas o uso de primers inadequados, ou seja, mesmo tendo sido rotulados como específicos apresentaram sequenciamento não compatível. Pode ter contribuído também o grande pool bacteriano no canal vaginal e anorretal, pois talvez o excesso de genes durante todos os procedimentos tenha interferido para que as bandas do EGB apareçam no gel de eletroforese. Do contrário, as 76 gestantes realmente não apresentaram o EGB, o que seria bastante raro. Além do que já fora exposto, segue uma tabela cujos dados não puderam ser interligados com os resultados, mas servem como informações adicionais a título de conhecimento. Nela, pode-se visualizar que muitas gestantes tinham somente o 1º grau completo (46%), 59,2% delas apresentaram ITU

(infecção do trato urinário) e que grande parte delas estava inclusa no grupo de alto risco obstétrico (72%).

Característica analisada	ITU		risco obstétrico		escolaridade			
	sim	não	alto	baixo	Analfabeto	1 grau ^o	2 grau ^o	3 grau ^o
n	45	31	54	22	4	35	25	12
%	59,2	41,8	72,0	28,0	5,3	46,0	32,9	15,8

Tabela 2 – Características adicionais.

4. Conclusão

Verificou-se, portanto, que a técnica de PCR não fora eficaz para rastrear o EGB nas gestantes atendidas na Maternidade Balbina Mestrinho, principalmente, pela dificuldade em se usar primers adequados para o sequenciamento. Apesar disso, o levantamento dos dados para se obter o perfil das gestantes selecionadas foi de grande utilidade. Isto tanto para se formar uma noção a nível de saúde pública, como por exemplo o expressivo número de gestantes com alto risco obstétrico, como também uma noção mais detalhada sobre a obstetria. Como poucos trabalhos foram realizados com EGB envolvendo gestantes e neonatos, espera-se que futuramente novos projetos de pesquisa na cidade de Manaus visem averiguar a presença deste microorganismo nas gestantes e caso este esteja em número expressivo, que seu reastreamento laboratorial seja incluso no protocolo de pré-natal.

5. Referências Bibliográficas

- Alfa, M.J.; Sepelri, S.; De Gagne, P.; Helawa, M.; Sandhu, G.; Harding, G.K. Real-time PCR assay provides reliable assessment of intrapartum carriage of group B Streptococcus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 48, n. 9, p. 3095-9, 2010.
- Aziz, N.; Baron, E.J.; D'souza, H.; Nourbakhsh, M.; Druzin, M.L.; Benitz, W.E. Comparison of rapid intrapartum screening methods for group B streptococcal vaginal colonization. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, v. 18, n. 4, p. 225-9, 2005.
- Atkins, K.L.; Atkinson, R.M.; Shanks, A.; Parvin, C.A.; Dunne, W.M.; Gross, G. Evaluation of polymerase chain reaction for group B Streptococcus detection using an improved culture method. *Obstet. Gynecol.*, v. 108, n. 3 pt 1, p. 488-91. 2006.
- Baker, C.J.; Edwards, M.S.; Group B streptococcal infections. In: Remington J, Klein J.O. (eds.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 3th ed. Philadelphia: PA Saunders; 1990. p. 742-97.
- Beraldo, C.; Brito, A.S.J.; Saridakis, H.O.; Matsuo, T. Prevalência da colonização vaginal e anorretal por estreptococo do grupo B em gestantes do terceiro trimestre. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 26, n. 7, p. 543- 9, 2004.
- Bergeron, M.G.; Danbing, K.; Ménard, C.; Picard, F.J.; Gagnon, M.; Bernier, M.; Ouellette, M.; Roy, P.H.; Marcoux, S.; Fraser, W.D. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N. Engl. J. Med.*, v. 343, n. 3, p. 175-179, 2000.
- Block, T.; Munson, E.; Culver, A.; Vaughan, K.; Hryciuk, J.E. Comparison of carrot broth- and selective Todd-Hewitt broth-enhanced PCR protocols for real-time detection of Streptococcus agalactiae in prenatal vaginal/anorectal specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v. 46, n. 11, p. 3615-20, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. *Pré-natal e Puerpério – Atenção Qualificada e Humanizada - Manual Técnico*. 3ª. Ed. Brasília: Editora MS, 2006.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *MMWR* 2010, v. 59 (No. RR-10), 2010.
- Dillon, J.R.H.C.; Gray, E.; Pass, M.A.; Gray, B.M. Anorectal and vaginal carriage of group B Streptococci during pregnancy. *J. Infect. Dis.*, v. 145, n. 6, p. 794-9, 1982.
- Diniz, C.G.; Farias, L.M.; Carvalho, M.A.R.; Rocha, E.R.; Smith, C. J. Differential gene expression in a Bacteroides fragilis metronidazole-resistant mutant. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, v. 54, n. 1, p. 100-108, 2004.
- Edwards, R.K.; Novak-Weekley, S.M.; Koty, P.P.; Davis, T.; Leeds, L.J.; Jordan, J.A. Rapid group B streptococci screening using a real-time polymerase chain reaction assay. *Obstet. Gynecol.*, v. 111, n. 6, p. 1335-41, 2008.
- El Helali, N.; Nguyen, J.C.; Ly, A.; Giovangrandi, Y.; Trinquart, L. Diagnostic accuracy of a rapid real-time polymerase chain reaction assay for uni- versalintrapartum group B Streptococcus screening. *Clin. Infect. Dis.*, v. 49, n. X, p. 417-23, 2009.
- Gavino, M.; Wang, E.A. comparison of a new rapid real-time polymerase chain reaction system to traditional culture in determining group B Streptococcus colonization. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 197, p. 388.e1-e4. 2007.
- Goodrich J.S.; Miller, M.B. Comparison of culture and 2 real-time polymerase chain reaction assays to detect group B Streptococcus during antepartum screening. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 59, p. 17-22, 2007.

- Hickman, M.E.; Rench, M.A.; Ferrieri, P.; Baker, C.J. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. *Pediatrics*, v. 104, n. 2, p. 203-9, 1999.
- Miura, E.; Martin, M.C.; Group B streptococcal neonatal infections in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 43, n. 5, p. 243-6, 2001.
- MOYO, S.R.; MUDZORI, J.; TSWANA, A.S.; MAELAND, J.A.; Prevalence, capsular type distribution, anthropometric and obstetric factors of group B Streptococcus (*Streptococcus agalactiae*) colonization in pregnancy. *Cent. Afr. Med.*, v. 46, p. 115-20, 2000.
- NOMURA M.L.; PASSINI JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, U.M.; CALIL, R. Colonização materna e neonatal por estreptococo do grupo B em situações de ruptura pré-termo de membranas e no trabalho de parto prematuro. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 31, n. 8, p. 397-403, 2009.
- PINHEIRO, R.S.; FERREIRA, L.C.L.; BRUN I.R.; GUILHERME, J.P.; MONTE, R.L. Estudo dos fatores de risco maternos associados à sepse neonatal precoce em hospital terciário da Amazônia brasileira. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 29, n. 8, p. 387-95, 2007.
- POGERE, A.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; FREITAS, P. F.; D'ACAMPORA, J.; ZUNINO, J. N. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 27, n. 4, p. 174-80, 2005.
- SCICCHITANO, L.; BOURBEAU, P. Comparative evaluation of the AccuProbe group B Streptococcus culture test, the BD GeneOhm Strep B assay, and culture for detection of group B streptococci in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.*, v. 47, n. 9, p. 3021-3, 2009.
- SCHRAG, S.J.; ZELL, E.R.; LYNFIELD, R.; ROOME, A.; ARNOLD, K.E.; CRAIG, A.S. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N. Engl. J. Med.*, v. 347, n. 4, p. 233-9, 2002.
- SCHUCHAT, A.; ZYWICKI, S.; DINSMOOR, M.J. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics*, v. 105, n. 1, p. 21-6, 2000.
- VACILOTO, E.; RICHTMANN, R.; DE PAULA, F.C.H.; KUSANO E.J.; DE ALMEIDA, M.F.; AMARO, E.R. A survey of the incidence of neonatal sepsis by group B Streptococcus during a decade in a Brazilian maternity hospital. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 6, n. 2, p. 55-62, 2002.
- TEESE, N.; HENESSEY, D.; PEARCE, C.; KELLY, N.; GARLAND, S. Screening protocols for group B Streptococcus: are transport media appropriate? *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, v. 11, p. 199-202, 2003.