

## VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE IST A PARTIR DO MATERIAL CLÍNICO POR qPCR-HRM.

Bolsista IC: Kamila Alexandra da Cunha Geraldeli; Orientador: Ivano de Filippis

Laboratório de Microrganismos de Referência - DM

### INTRODUÇÃO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) são doenças transmitidas por via sexual, ou seja, por relações sexuais sem o uso de preservativos. Diferentes agentes etiológicos podem causar IST, apresentando diferentes sintomas, como feridas, verrugas, disúria, corrimento, abortos, etc. Entre as IST causadas por bactérias, a gonorreia causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae*, é uma das mais frequentes no mundo, com 78 milhões de pessoas infectadas por ano. No Brasil não é diferente, no entanto como apenas os casos de HIV e de sífilis são notificados obrigatoriamente ao Ministério da Saúde, é difícil ter estatísticas fidedignas sobre as outras IST.

A *N. gonorrhoeae* é uma bactéria em forma de cocos, Gram negativa e considerada fastidiosa, isto é, de difícil cultivo. Os novos métodos de diagnóstico molecular baseados na PCR nos permitem a detecção do DNA genômico deste agente diretamente do material clínico (geralmente secreção uretral) e também de genes associados à resistência microbiana também por PCR convencional ou PCR em tempo real (qPCR) com uso de sondas (Taqman).

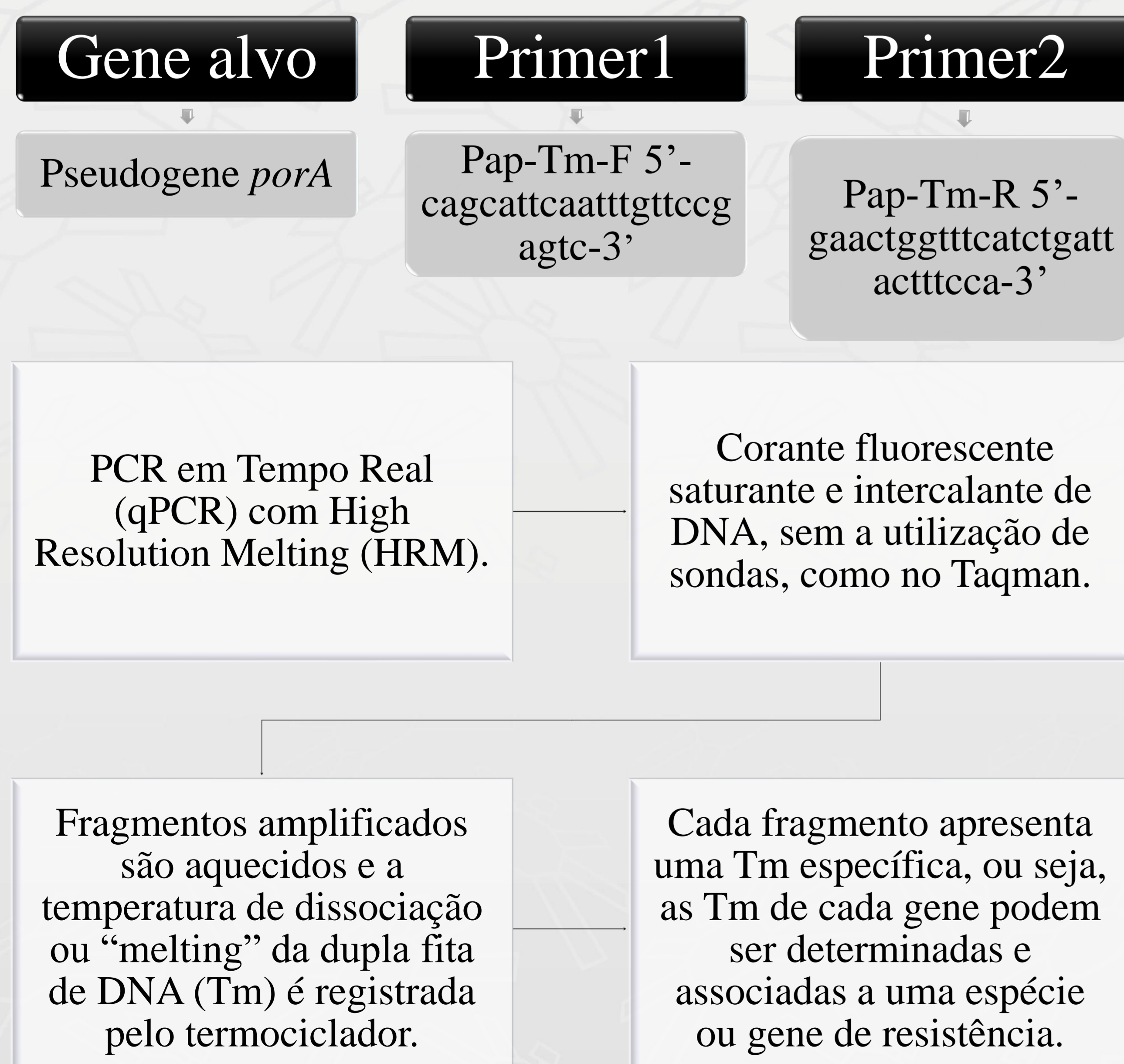
Outro patógeno ainda pouco conhecido, a bactéria *Sneathia amnii*, classificada no ano de 2002, se trata de uma bactéria Gram-negativa, fastidiosa e com necessidades nutricionais complexas e exigentes, cresce em ágar sangue em aproximadamente 3 dias de incubação. Espécies de *Sneathia spp* fazem parte da microbiota normal do trato geniturinário de homens e mulheres e estão associadas a uma grande variedade de condições clínicas, como a vaginose bacteriana, corioamnionite clínica, trabalho de parto prematuro, o aborto espontâneo, seps neonatal e bacteremia, infecção por HPV, displasia cervical e aumento do risco de infecção por HIV. Se trata de um patógeno de grande importância clínica, sendo necessário uma investigação para detecção do mesmo.

### OBJETIVO

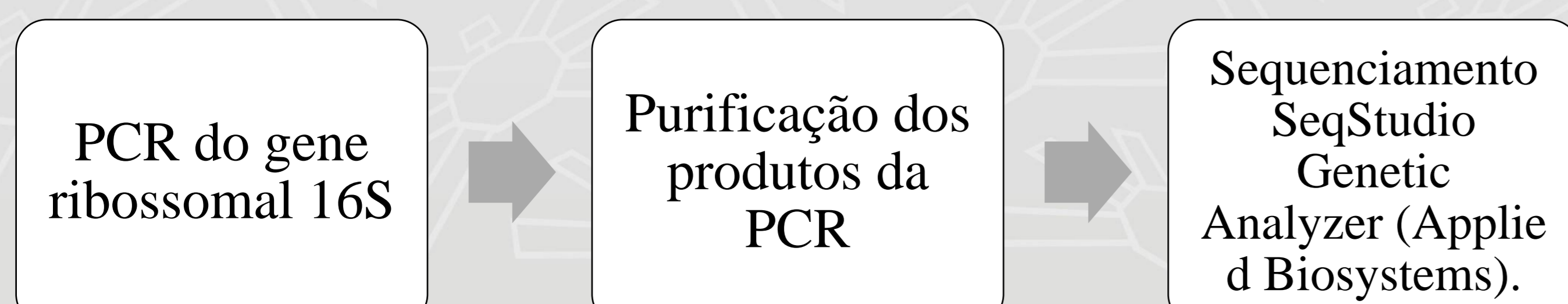
- Desenvolver um sistema de diagnóstico de baixo custo para as IST, a partir do material clínico, utilizando qPCR e como pós análise o High Resolution Melting (HRM).
- Detecção da bactéria *Sneathia amnii* a partir de material clínico de IST, utilizando PCR do gene ribossomal 16S e posteriormente o sequenciamento.

### METODOLOGIA

- qPCR-HRM (*N. gonorrhoeae*)



- PCR CONVENCIONAL (*Sneathia amnii*)



### RESULTADOS PRELIMINARES

- Foram analisadas 6 cepas de referência (Figura 1), para a determinação da Tm específica da espécie. A Tm para identificação da *N. gonorrhoeae* foi determinada em 81,9°C e a faixa de detecção é de 80,9°C a 81,9°C.

Cepas de referência	Origem	Tm*
INCQS 00267	ATCC 19424	81,97°C
INCQS 00137	CDC 76-061782	81,91°C
INCQS 00601	IAL 1991	81,46°C
INCQS 00602	IAL 1890	81,92°C
INCQS 00603	IAL 1891	81,87°C
INCQS 00605	IAL 652	81,88°C

Figura 1. Média da Tm após várias repetições em dias diferentes.

- Resultado da qPCR-HRM das amostras clínicas com suspeita de *N. gonorrhoeae*, foram confirmadas apresentando Tm dentro da faixa definida para as cepas de referência. (Figura 2)

Cepa INCQS	Espécie	Tm
P6379	<i>N.gonorrhoeae</i>	81,06°C
P6380	<i>N.gonorrhoeae</i>	81,18°C
P7404	<i>N.gonorrhoeae</i>	81,28°C
P7405	<i>N.gonorrhoeae</i>	81,10°C
P7406	<i>N.gonorrhoeae</i>	81,95°C
P7407	A determinar	77,98°C
XXXXX	<i>N. gonorrhoeae</i>	81,42°C
XXXXX	<i>N. gonorrhoeae</i>	81,07°C

Figura 2. Resultado das Tm registradas de amostras clínicas suspeita de *N.gonorrhoeae*

- Para investigação da *Sneathia amnii*, foram selecionados 6 amostras de material clínico de IST (Figura3), já com DNA extraído. Após a amplificação do 16S das amostras, foi realizado a purificação dos produtos da PCR e posteriormente o sequenciamento realizado no sequenciador automático SeqStudio Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Cepa INCQS	Identificação	Similaridade de (%)
M	<i>Lactobacillus iners</i>	97.84
L	<i>Delftia acidovorans</i>	98.64
MP	<i>Streptococcus pyogenes</i>	99.13
N	<i>Lactobacillus crispatus</i>	98.63
MB	<i>Lactobacillus crispatus</i>	99.15
AC	<i>Lactobacillus iners</i>	97.87

Figura 3. Resultado do sequenciamento de amostras para investigação da bactéria *Sneathia amnii*

### CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos mostram a possibilidade de se utilizar um método sensível e específico com menor custo para o diagnóstico de *N. gonorrhoeae*.
- Em relação à *Sneathia spp*, é necessário uma investigação profunda com a detecção da espécie entre as amostras clínicas, pois se trata de um microrganismo fastidioso de difícil cultivo, pode não estar sendo detectado com grande risco para os pacientes.