



**Estudo da colonização por *Streptococcus agalactiae*, de
mulheres em idade fértil, na área metropolitana do Porto**

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Análises Clínicas
Trabalho realizado sob a orientação da Professora Doutora Helena Maria Neto Ferreira
de Sousa

Bárbara Arruda Chaves

Junho de 2011

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado a todos os que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Helena Maria Neto Ferreira de Sousa, minha orientadora, pelo excelente acompanhamento, incentivo, disponibilidade e otimismo demonstrados durante a realização deste trabalho. Gostaria ainda de agradecer todo o seu conhecimento, conselhos, ideias e valiosas sugestões apresentadas, que contribuíram para os resultados apresentados.

Aos meus colegas do Laboratório Médico de Análises Clínicas Doutor João Pessanha Moreira, pela oportunidade da realização deste trabalho, com a autorização para o levantamento de dados estatísticos, assim como pelo apoio e compreensão demonstrados ao longo da concretização desta dissertação de Mestrado.

À minha colega do Mestrado, Eduarda, pela sua amizade e disponibilidade.

A todos, deixo aqui o meu sincero agradecimento.

RESUMO

O *Streptococcus agalactiae* (grupo B de Lancefield, SGB) é um microrganismo comensal do homem, no entanto, tem sido associado a infecções em grávidas e recém-nascidos, sendo o principal agente etiológico de septicemia e meningite neonatal.

Para prevenir a infecção neonatal recomenda-se a pesquisa da bactéria na região recto-vaginal, entre as 35 e 37 semanas de gestação, sendo indicada quimioprofilaxia durante o parto, às grávidas colonizadas.

Este estudo teve como objectivo confirmar a importância do rastreio através da verificação da colonização por *Streptococcus agalactiae* de mulheres em idade fértil, (grávidas ou que pretendam engravidar) na área metropolitana do Porto. Dessa forma, a gravidez, assim como a idade das mulheres, foram factores importantes a considerar.

O estudo foi desenvolvido entre Janeiro de 2009 e Abril de 2011, e envolveu 195 mulheres, com idades entre os 14 e os 50 anos.

Foram realizados 148 análises bacteriológicas dos exsudados vaginais em mulheres em idade fértil, e 47 rastreios específicos para *Streptococcus agalactiae*, em mulheres grávidas.

As colheitas foram efectuadas com zaragoas estéreis, posteriormente colocadas em meio selectivo de Todd-Hewitt. Procedeu-se às provas de identificação presuntiva do *Streptococcus agalactiae* (coloração pelo método de Gram, observação microscópica, prova da catalase), assim como a provas confirmatórias (CAMP e aglutinação em látex).

A incidência da colonização por *Streptococcus agalactiae* nas mulheres que realizaram o exsudado vaginal foi de 13%, e nas grávidas que efectuaram a pesquisa específica do *Streptococcus agalactiae* foi de 15%, dados estes que estão concordantes com a literatura.

É, portanto, importante detectar a colonização por *Streptococcus agalactiae* devido às complicações ginecológicas e obstétricas que este agente patogénico pode provocar.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, gravidez, idade fértil, recém-nascido.

ABSTRACT

Streptococcus agalactiae (Lancefield group B, GBS) is a commensal microorganism of man, however it has been associated with infections in pregnant women and newborn, being the main agent of sepsis and neonatal meningitis.

To prevent neonatal infection, the search of the bacteria in recto-vaginal region, between the 35 and 37 weeks of pregnancy is recommended, being indicated antibiotic treatment during the delivery of colonized women.

The goal of this study was to confirm the importance of screening, through the verification of colonization by *Streptococcus agalactiae* in childbearing age (pregnant or considering pregnancy), in metropolitan area of Porto.

Therefore, pregnancy and the woman's age were important factors to consider.

This study was developed from January 2009 to April 2011, involving 195 women, aged between 14 and 50 years old.

During the study, 148 bacteriological analysis of vaginal swabs were performed in women in childbearing age, and 47 specific swabs to screen the *Streptococcus agalactiae* in pregnant women.

Samples were obtained with sterile swabs and placed in selective culture medium of Todd-Hewitt. Tests to presumptive identification of GBS (microscopic observation of Gram stained smear, evidence of catalase) were made and also confirmatory tests (CAMP and latex agglutination).

The incidence of colonization of *Streptococcus agalactiae* in women who did the vaginal swab was 13%, and in pregnant women who did a specific search of *Streptococcus agalactiae* was 15%, which is consistent with the literature.

It is therefore important to detect the colonization by *Streptococcus agalactiae* due to gynecologic and obstetric complications that this pathogen can cause.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, pregnancy, childbearing age, newborn.

ÍNDICE

	Página
CAPÍTULO I – Introdução	1
História.....	2
Características do <i>Streptococcus agalactiae</i>	3
Epidemiologia da Infecção por <i>Streptococcus agalactiae</i>	6
Doença Neonatal de Início Precoce.....	8
Doença Neonatal de Início Tardio.....	9
Infecções Maternas.....	11
Pesquisa Laboratorial de <i>Streptococcus agalactiae</i>	12
Quimioprofilaxia e Considerações Terapêuticas.....	16
Acompanhamento Clínico da Criança.....	18
Perspectivas para o Futuro.....	19
CAPÍTULO II – Objectivos	21
CAPÍTULO III – Materiais e Métodos	23
Metodologia.....	24
População e Amostra.....	24
Colheita e Processamento da Amostra.....	26
Recolha de Dados.....	27
CAPÍTULO IV – Resultados	28
CAPÍTULO V – Discussão	35
CAPÍTULO VI – Conclusões	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: <i>Streptococcus agalactiae</i> observado ao microscópio óptico após coloração de Gram.....	4
Figura 2: Teste de CAMP. Colônias com aspecto cremoso e zona de β -hemólise podem ser observadas.....	4
Figura 3: Prova da Catalase. O <i>Streptococcus agalactiae</i> apresenta esta prova negativa.....	5
Figura 4: Teste de aglutinação em látex – marca Streptex®.....	13
Figura 5: Algoritmo para a pesquisa em laboratório da colonização pré-natal por <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
Figura 6: Meio de transporte de Stuart, composto por zaragatoa e tubo fechado, contendo o meio.....	26
Figura 7: Relação dos resultados obtidos nos exsudados vaginais das mulheres em idade fértil, no período de tempo de 2009 a 2011.....	29
Figura 8: Incidência da colonização por <i>Streptococcus agalactiae</i> , nos diferentes grupos etários, no período de tempo de 2009 a 2011.....	30
Figura 9: Resultados dos exsudados com colonização positiva para o <i>Streptococcus agalactiae</i> , nos diferentes anos em que decorreu o estudo.....	31
Figura 10: Resultados da análise específica de colonização por <i>Streptococcus agalactiae</i> , em mulheres grávidas, e segundo os diferentes grupos etários.....	32
Figura 11: Relação dos resultados positivos da análise específica de colonização por <i>Streptococcus agalactiae</i> , em mulheres grávidas, com o número de análises realizadas, nos diferentes grupos etários.....	33

Figura 12: Resultados das pesquisas positivas específicas para *Streptococcus agalactiae*, nos diferentes anos em que decorreu o estudo..... 34

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Características da espécie <i>Streptococcus agalactiae</i>	5
Tabela 2: Manifestações clínicas neonatais da doença por <i>Streptococcus agalactiae</i>	9
Tabela 3: Número e percentagem de mulheres, segundo a classe etária, que realizaram um exsudado vaginal, entre 2009 e 2011.....	25
Tabela 4: Número e percentagem de mulheres, segundo a classe etária, que realizaram uma pesquisa específica para o <i>Streptococcus agalactiae</i> , entre 2009 e 2011.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AC: Antes de Cristo

ACOG: American College of Obstetricians and Gynecologists (Colégio Americano de Obstetrícia e Ginecologia)

β: Beta

CAMP: Christie, Atkins, Munch e Peterson

CDC: Centers for Disease Control and Prevention (Centro para o Controlo e Prevenção de Doenças)

“Cut-off”: “Valor limite”

DEVANI: Design of a vaccine to immunize neonates against GBS infections through a durable maternal immune response (desenho de uma vacina para imunizar os recém-nascidos contra as infecções por SGB, com transferência placentária da imunidade materna protectora para o feto)

EUA: Estados Unidos da América

FDA: Food and Drug Administration (Administração Americana de Controlo de Alimentos e Fármacos)

IV: Intravenoso

mg/mL: Miligrama por mililitro

n: Número de representantes da amostra

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacção em Cadeia por acção da Polimerase)

SGB: *Streptococcus* β-hemolítico do grupo B

SXT: Trimetoprim + Sulfametoxazol

°C: Graus Celsius

®: Marca registada

%: Por cento

<: Menor

>: Maior

Capítulo 1. **INTRODUÇÃO**

HISTÓRIA

A sépsis neonatal é descrita desde 1500 AC, em antigos textos indianos, que reportavam que a boa higiene prevenia a doença neonatal. Em 1879, Louis Pasteur identificou o *Streptococcus*, isolado de lesões supurativas no homem, como o organismo envolvido neste quadro clínico (Murray *et al*, 2007).

As primeiras classificações do *Streptococcus spp.* eram baseadas exclusivamente na actividade hemolítica e nas reacções serológicas com anticorpos de Lancefield. Por volta de 1930, no Instituto Rockefeller em Nova York, Rebecca Lancefield revelou o seu sistema de classificação para *Streptococcus* hemolíticos, baseado nas características antigénicas de um carboidrato da parede bacteriana, o carboidrato C. Esta classificação ficou conhecida como a classificação de Lancefield.

Através da utilização de testes de precipitação, baseados nas diferenças antigénicas, os *Streptococcus* foram divididos em vários grupos (A, B, C, E, F, G, H e K). Contudo, verificou-se que não era possível classificá-los apenas com base no grupo serológico, pois, espécies com o mesmo grupo de antígenos, são fisiologicamente diferentes, como é o caso do *S. bovis* e o *S. faecalis* (Murray *et al*, 2007; Borger *et al*, 2005).

Desde então, o *Streptococcus* β -hemolítico do grupo A (*Streptococcus pyogenes*) foi amplamente reconhecido como um dos principais patogénicos associados à sépsis puerperal, até 1937, quando Fry reportou sete casos fatais de febre neonatal associados ao *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B (SGB) (Fry, 1938). No entanto, só em 1970, o SGB foi descrito como o maior agente patogénico responsável por infecções neonatais (sépsis, pneumonia e meningite) (Faro *et al*, 2010).

CARACTERÍSTICAS DO *Streptococcus agalactiae*

Nas últimas décadas, o *Streptococcus agalactiae* ou SGB tornou-se a principal causa de sépsis neonatal, meningite e pneumonia, afectando 1 a 2 recém-nascidos em cada 1000 nascimentos, na Europa (Afshar *et al*, 2011).

Apresentam morfologia de cocos Gram positivo, dispostos em cadeias ou aos pares, membro da flora bacteriana normal, podendo ser encontrado nas vias aéreas superiores, tracto intestinal e vaginal (Figura 1) (Beitune *et al*, 2005).

Uma vez que estas bactérias têm exigências nutricionais específicas, para o seu isolamento, é necessário o uso de meios enriquecidos com sangue ou soro, sendo o mais utilizado o meio líquido de Todd-Hewitt. Estas bactérias são fermentadoras de hidratos de carbono, são catalase negativa (Figura 3), imóveis e apresentam um padrão de β -hemólise (Murray *et al*, 2006).

A classificação puramente baseada em padrões hemolíticos, não era suficiente para correlacionar o microrganismo com a doença ou com o prognóstico. O *Streptococcus agalactiae* pertence ao subgrupo B de Lancefield, tendo sido classificado com base em reacções serológicas por Rebecca Craighill Lancefield em 1933 (Borger *et al*, 2005).

A β -hemólise discreta, as características microscópicas após coloração de Gram, o teste da hidrólise do hipurato e o teste de CAMP positivo são testes que permitem identificar presuntivamente o *Streptococcus agalactiae* (Borger *et al*, 2005). Contudo, a confirmação da identificação é realizada por meio de testes serológicos para detecção do antígeno do grupo B, com a utilização de anti-soros específicos (Ruoff *et al*, 2003).

A principal característica do *Streptococcus agalactiae* é a presença do antígeno do grupo B, polissacarídeo da parede celular, apesar de não ser específico da espécie, uma vez que o *S. halichoeri* também o possui.

Quanto aos marcadores serológicos, podem ser: antígeno polissacarídico da parede celular específico do grupo (antígeno do grupo B), polissacarídeos capsulares, e proteína de superfície (proteína C) (Murray *et al*, 2006).

Existe nove serótipos antigenicamente distintos, com base na sua estrutura capsular polissacarídica (tipo Ia, Ib, II - VIII) identificados até à data (Shet and Ferrieri, 2004).

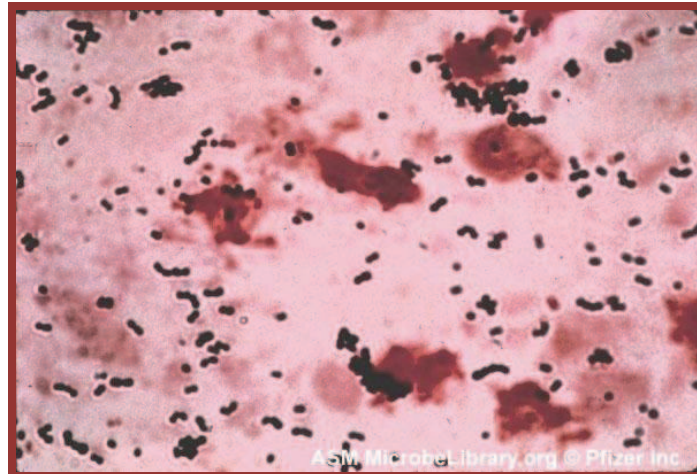


Figura 1: *Streptococcus agalactiae* observado ao microscópio óptico após coloração de Gram (Adaptado de: American Society for Microbiology, 2007)

Um dos testes fenotípicos que se realiza no processo de identificação do *Streptococcus agalactiae* é o teste de CAMP. O factor CAMP foi descrito pela primeira vez em 1944, e este teste é baseado na detecção desse factor, que potencializa a acção lítica da β -hemolisina do *Staphylococcus aureus*, sobre as hemácias da gelose de sangue, tendo como efeito a formação de uma área de hemólise sinérgica, típica, produzida pela acção da esfingomielinase (β -toxina) dos *Staphylococcus* e a ceramida (N-acetil-esfingosina), uma proteína de ligação do *Streptococcus agalactiae*. O sinergismo apresenta uma forma de seta ou meia-lua, quando esses microrganismos são semeados sob a forma de estrias perpendiculares (Figura 2) (Murray *et al*, 2007).

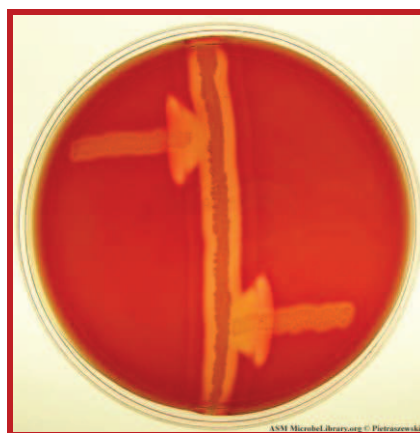


Figura 2: Teste de CAMP. Colónias com aspecto cremoso e zona de β -hemólise podem ser observadas (Adaptado de: American Society for Microbiology, 2006)



Figura 3: Prova da Catalase. O *Streptococcus agalactiae* apresenta esta prova negativa. (Adaptado de: Baron, 2007)

Assim, para a identificação do *Streptococcus agalactiae*, recorre-se a uma classificação complexa, sendo que nos laboratórios de rotina é baseada na hemólise, serologia e propriedades bioquímicas (Tabela 1). A nível de investigação, a genética contribui com uma importante ajuda na classificação (Shet and Ferrieri, 2004).

Tabela 1: Características da espécie *Streptococcus agalactiae*

Espécie	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Morfologia	Cocos
Coloração de Gram	Gram +
Padrão de hemólise	β-Hemólise
Classificação serológica	B
Hidrólise do Hipurato	+
Teste CAMP	+
Catalase	-
Hidrólise da esculina	-
Sensibilidade à bacitracina	R
Sensibilidade à optoquina	R

R= Resistente

EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *Streptococcus agalactiae*

Durante os anos 1970 e 1980, o *Streptococcus agalactiae* surgiu como um agente patogénico neonatal e materno, relevante nos Estados Unidos da América (EUA) e Europa Ocidental, com taxas de mortalidade nos recém-nascidos de 15 a 50%. Nos EUA, 10 a 35% das mulheres grávidas são portadoras assintomáticas de SGB no tracto genital e gastrointestinal, no momento do parto (Shet and Ferrieri, 2004; Pass *et al*, 1979).

Esta bactéria é comensal no Homem, colonizando a pele, o tracto respiratório superior, o tubo digestivo e o aparelho urogenital de muitos indivíduos saudáveis. O SGB também é capaz de causar infecções invasivas em adultos não gestantes, especialmente idosos e imunodeprimidos (Jackson *et al*, 1995; Farley, 2001). A distribuição dos serótipos é bastante diferente nesses adultos, comparativamente às grávidas e recém-nascidos, sendo o serótipo V responsável por 30 a 45% das infecções invasivas (Shet and Ferrieri, 2004; Harrison *et al*, 1998).

Sob o ponto de vista de patogenicidade, este agente tem particular interesse na grávida pois pode provocar infecção no tracto urinário, amnionite, endometrite e bacteriémia, e no recém-nascido pode ser responsável por quadros graves de septicemia e meningite, durante os períodos neonatal e perinatal, além da ocorrência de partos prematuros, ou nascimentos de crianças de termo, com baixo peso corporal (Areal *et al*, 2010).

A partir do recto, a bactéria coloniza a vagina e migra pelo colo do útero por via ascendente, onde desenvolve a infecção, podendo alterar o muco cervical, e dessa forma, numa grávida, pode provocar a ruptura prematura de membranas e iniciar o parto.

O reconhecimento de que a colonização materna com este microrganismo é um factor chave para a ocorrência de altas taxas de morbidade e mortalidade no recém-nascido, foi um marco na história da saúde neonatal, sendo o SGB o agente bacteriano mais importante da infecção neonatal precoce (Díaz and Nieves, 2008).

A mudança nas práticas de saúde ajudou a diminuir a mortalidade e morbidade associadas à doença (Shet and Ferrieri, 2004; Areal, 2009).

A incidência da colonização por *Streptococcus agalactiae* durante a gravidez é variável. Foi realizado um estudo, num grupo de mulheres grávidas entre a 26^a e 28^a semana de gestação, onde apenas 65% permaneceram colonizadas até ao final da gestação, enquanto 8% das que tinham culturas pré-natais negativas, estavam positivas no termo da gravidez. O tratamento com antibiótico dessas mães colonizadas conseguiu

erradicar, temporariamente, o microrganismo, mas a maioria das mulheres foi recolonizada dentro de seis semanas (Shet and Ferrieri, 2004; Pass *et al*, 1979).

No momento do parto, 50 a 65% das crianças nascidas de mães colonizadas têm culturas positivas de SGB, a partir de mucosas (oral, nasofaríngea, vaginal e anal) e pele (canal auditivo externo, garganta, umbigo, zona anorectal). Aproximadamente 98% dos recém-nascidos colonizados permanecem saudáveis, mas 1 a 2% desenvolvem infecção sintomática invasiva, por SGB, nas primeiras 24 horas de vida (Shet and Ferrieri, 2004; Joachim *et al*, 2009).

Os dados preliminares de um estudo realizado pela Sociedade Portuguesa de Pediatria, cujo registo se iniciou em 2001, apontam para uma incidência da infecção neonatal em Portugal de 0,5 em 1000 nados vivos, e uma taxa de mortalidade que varia entre 4 e 6% no recém-nascido de termo, sendo mais elevada nos prematuros (Areal *et al*, 2010).

Os nascimentos prematuros e os abortos, muitas vezes não são investigados, razão pela qual a carga total da doença neonatal por SGB permanece desconhecida.

Em Portugal é desconhecida a frequência de colonização por SGB nas gestantes e não existe um protocolo nacional obrigatório de rastreio bacteriológico materno, apesar de em 2004 terem sido publicados os Consensos Nacionais em Neonatologia sobre a prevenção da infecção por SGB, sugerindo um protocolo de actuação nacional uniforme (Almeida *et al*, 2004; Areal, 2009).

A doença neonatal segue dois padrões distintos: “a doença de início precoce” que ocorre em 75% dos casos, e se manifesta na primeira semana de vida (geralmente antes das 72 horas), e a “doença de início tardio”, que surge entre a primeira e a quarta semana de vida (Areal *et al*, 2010).

O tracto gastrointestinal baixo é considerado o reservatório humano mais provável de SGB, com alguma colonização do tracto geniturinário. As mulheres grávidas portadoras deste microrganismo têm potencial para transmiti-lo à descendência. O espectro de infecções maternas e fetais por SGB vão desde a colonização assintomática à sépsis (Bahia and Shahnaz, 2008; Aila *et al*, 2010).

DOENÇA NEONATAL DE INÍCIO PRECOCE

A doença neonatal de início precoce ocorre, geralmente, por transmissão vertical da bactéria, da mãe para o feto, adquirida por via intra-amniótica ou directamente durante a passagem pelo canal de parto. Este padrão da doença desenvolve-se na primeira semana de vida do recém-nascido.

O factor de risco mais importante para a infecção de início precoce por *Streptococcus agalactiae*, é a presença do organismo no tracto genitourinário materno, no momento do parto. A disseminação ascendente da bactéria, pelo tracto genital materno, leva ao atingimento do líquido amniótico, que pode ser aspirado pelo feto, em geral após a ruptura das membranas amnióticas (Shet and Ferrieri, 2004; Beitune *et al*, 2005).

Em mais de 80% dos recém-nascidos, a sintomatologia inicial apresenta um envolvimento pulmonar, podendo progredir para pneumonia e septicemia. Contudo, 5 a 10% dos recém-nascidos também evoluem para um quadro de meningite. O envolvimento meníngeo pode ser inicialmente inaparente, sendo por isso necessário realizar em todas as crianças com suspeita de infecção, uma análise ao líquido cefaloraquidiano. A incidência da doença de início precoce é cerca de dez vezes superior em prematuros do que em recém-nascidos de termo (Shet and Ferrieri, 2004; Murray *et al*, 2006).

A sépsis severa ocorre devido à invasão intravascular de bactérias e posterior incapacidade do hospedeiro para as eliminar. Mais de 98% dos casos de sépsis neonatal por SGB são consequência da transmissão vertical a partir do tracto genital da mãe (Tabela 2) (Bahia and Shahnaz, 2008).

DOENÇA NEONATAL DE INÍCIO TARDIO

A doença neonatal de início tardio desenvolve-se entre os sete dias de vida e os três meses de idade, sendo a idade média de aparecimento da doença, um mês de idade.

A transmissão pode ser horizontal, vertical ou nosocomial. Estas crianças têm quase sempre uma história neonatal precoce não significativa e, posteriormente, apresentam meningite ou septicemia. Também podem ocorrer infecções osteoarticulares.

Ao contrário do que acontece na doença neonatal de início precoce, neste caso o envolvimento pulmonar é um sintoma menos comum (Tabela 2). Mais de 20% dos sobreviventes de meningite provocada pelo SGB têm sequelas neurológicas permanentes, incluindo perda neurosensorial auditiva, atraso mental, cegueira cortical e convulsões (Shet and Ferrieri, 2004).

Tabela 2: Manifestações clínicas neonatais da doença por *Streptococcus agalactiae*

	Doença de Início Precoce	Doença de Início Tardio
Aparecimento dos Sintomas	Primeira semana de vida (geralmente em 24 horas)	Primeira semana até três meses de idade
Manifestações Clínicas	Dificuldade respiratória, Pneumonia, Septicemia	Septicemia, Meningite, Osteoartrites
Incidência de Prematuridade	Aumentada	Não alterada
Transmissão	Vertical (<i>in utero</i> ou <i>intrapartum</i>)	Geralmente horizontal (pode também ser <i>intrapartum</i>)
Serótipos predominantes	Ia, III, V	III, Ia, V
Mortalidade	10-15 %	2-6 %

(Adaptado de: Shet and Ferrieri, 2004)

Estudos realizados recentemente nos EUA desmonstraram que os serótipos Ia, III e V (numa frequência decrescente) foram responsáveis por 78 a 87% da doença invasiva de início precoce (até sete dias após o nascimento) nos recém-nascidos.

A forma tardia da doença, em recém-nascidos dos 7 aos 90 dias de vida, é dominada pelo serótipo III, seguido do serótipo Ia e V (Shet and Ferrieri, 2004; Baker and Barrett, 1974; Martins *et al*, 2007; Afshar *et al*, 2011).

Consideram-se como factores de risco para a infecção neonatal por SGB as seguintes situações: (Areal *et al*, 2010; Beitune *et al*, 2005)

- colonização materna por SGB, detectada entre as 35 e 37 semanas de gestação;
- infecção do trato urinário por SGB, em qualquer altura da gestação;
- gravidez anterior com infecção neonatal precoce por SGB;
- parto prematuro (idade gestacional < 37 semanas completas);
- ruptura de membranas superior a 18 horas;
- temperatura materna *intrapartum* superior a 38°C;
- infecção intra-amniótica (corioamnionite).

INFECÇÕES MATERNAS

Apesar de, na maior parte das mulheres grávidas, a infecção por *Streptococcus agalactiae* ser geralmente assintomática, este agente pode causar uma significativa morbidade nesse grupo de mulheres.

Manifestações de infecção sintomática incluem corioamnionite, endometrite, cistite, pielonefrite e bacteriemia febril. A cesariana parece ser um factor de risco importante para a endometriose pós-parto. A colonização por SGB foi significativamente associada ao trabalho de parto prolongado, ruptura prematura de membranas e parto prematuro.

A colonização estreptocócica genital foi considerada uma possível causa de partos prematuros e ruptura prematura de membranas, embora ainda não haja uma evidência definitiva de relação causa-efeito. Vários estudos prospectivos também têm sugerido que a colonização por SGB pode ser uma causa de ocorrência de óbitos intra-uterinos, abortos e baixo peso à nascença (Shet and Ferrieri, 2004).

A colonização da grávida no início da gestação não tem valor preditivo na infecção neonatal, assim como a terapêutica pré-natal se mostra objectivamente inefectiva, visto que esta colonização pode ser transitória, crónica ou intermitente (Areal *et al*, 2010; Beitune *et al*, 2005).

A presença de anticorpos maternos para polissacarídeos capsulares específicos dos serótipos do SGB, confere protecção contra a aquisição da doença neonatal por *Streptococcus agalactiae*. Estudos realizados demonstraram que grávidas colonizadas com elevados níveis serológicos de anticorpos, foram menos propensas a ter filhos com doença neonatal invasiva. Além disso, crianças infectadas tinham baixos níveis de anticorpos específicos para o serótipo infeccioso. Num estudo recente, foi demonstrado que as mulheres grávidas colonizadas com SGB serótipo Ia, II, III e V (os serótipos mais comuns) apresentavam concentrações de Imunoglobulinas G específicas para o polissacarídeo capsular da sua estirpe, significativamente maiores no parto, do que as mulheres não colonizadas (Shet and Ferrieri, 2004; Edwards, 2008).

PESQUISA LABORATORIAL DE *Streptococcus agalactiae*

O índice de isolamento do microrganismo depende de vários factores relacionados com a colheita e metodologia laboratorial utilizada.

A amostra para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae* é colhida em grávidas, em ambulatório ou hospitalizadas. Esta colheita deve ser realizada segundo as recomendações do Centers of Disease Control and Prevention (CDC), em 2002, e posteriores “guidelines” revistas em 2010.

Assim, e cumprindo as referidas recomendações, tem sido demonstrado que a colheita de amostra recto-vaginal, executada com a mesma zaragatoa, apresenta um índice de positividade duas vezes superior ao da colheita de material apenas vaginal (CDC, 2010).

Por outro lado, em amostras com baixa densidade bacteriana, há comprometimento da viabilidade celular, mesmo quando as zaragatoas são preservadas em meio de transporte.

Após a colheita, deve-se remover a(s) zaragatoa(s) do meio de transporte e inocular num meio de cultura enriquecido e selectivo, contendo agentes antimicrobianos para inibir o crescimento de bacilos Gram negativos e de outros microrganismos da flora vaginal, aumentando a possibilidade de crescimento do SGB em aproximadamente 50%. Alguns estudos referem que a sensibilidade da cultura aumenta quando se usa um caldo enriquecido e selectivo como método de detecção primária, comparativamente a uma cultura em placa de gelose simples (Díaz and Nieves, 2008).

O meio selectivo mais utilizado é o caldo de Todd-Hewitt, suplementado com gentamicina (8 mg/mL) ou colistina (10 mg/mL) e ácido nalidíxico (15 mg/mL), agentes antibacterianos que inibem o crescimento da maioria dos microrganismos Gram negativo da flora polimicrobiana (Shet and Ferrieri, 2004; Beitune *et al*, 2005; Borger *et al*, 2005). O meio de Todd-Hewitt é incubado durante 18 a 24 horas a 35-37°C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono, segundo as recomendações do CDC. Posteriormente, semea-se em gelose de sangue e incuba-se nas mesmas condições.

Identifica-se os microrganismos sugestivos de SGB, através da observação de β -hemólise e das características das colónias (CDC, 2010).

Para a confirmação da espécie *Streptococcus agalactiae*, depois de efectuada a cultura, realizam-se os testes rápidos de diagnóstico, que são baseados na identificação do antígeno polissacarídico específico de grupo, em aglutinação em látex, com período

de incubação de 10 minutos (ex: Streptex[®]), a partir de amostras obtidas com zaragatoa (ensaio imunoenzimático). Estes testes têm uma sensibilidade e especificidade perto dos 100% (Figura 4) (Beitune *et al*, 2005).

Alguns investigadores tentam aumentar a sensibilidade usando meios de enriquecimento antes do teste antigénico. Recentes desenvolvimentos de PCR em tempo real e de tecnologia de fluorescência têm proporcionado novas plataformas de detecção para a identificação bacteriana, no entanto, o custo efectivo desses novos métodos ainda vai ser estabelecido (Shet and Ferrieri, 2004; Das *et al*, 2003).

Estes testes baseiam-se na detecção do gene *cfb* por PCR, em tempo real, e os resultados são obtidos em poucas horas com uma sensibilidade de 94% e especificidade de 95,9%. São testes avaliados e aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), para zaragatoas com amostra recto-vaginal. Desta forma, é possível obter resultados num curto período de tempo, e o estado de colonização vaginal pode ser conhecido na altura do parto (Murray *et al*, 2007).

Na detecção de *Streptococcus agalactiae* em exsudados recto-vaginais, a aplicação da técnica de PCR, aumentou o resultado de mulheres colonizadas por este agente, em comparação com a cultura, mostrando dessa forma a sua eficácia (Aila *et al*, 2011).

Após a identificação do isolado bacteriano, é realizado o antibiograma, em equipamento automático ou manualmente.



Figura 4: Teste de aglutinação em látex – marca Streptex[®] (Adaptado de: Remel)

A recomendação da cultura bacteriana, para pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, é baseada no facto de que 86% dos casos da doença neonatal de início precoce são impedidos quando a pesquisa é realizada entre as 35 e 37 semanas de gestação, seguida de tratamento, em oposição a uma taxa de 68,8% de prevenção baseada em factores de risco maternos. Contudo, a necessidade de um período médio de 48 a 72 horas para a obtenção de microrganismos viáveis, torna-se uma limitação, tornando-se menos útil quando a mulher se encontra em trabalho de parto (Shet and Ferrieri, 2004).

Aproximadamente 6 a 13% dos recém-nascidos colonizados por SGB durante as primeiras 48 horas de vida, são nascidos de mulheres com resultados negativos nas culturas para a detecção de SGB, demonstrando as limitações da cultura como uma estratégia de pesquisa da colonização. Em alguns casos, esta limitação pode ser devido à queda exponencial do número de colónias, uma vez que as zaragatoas podem ser mantidas fora do meio de transporte, e também devido ao uso de antibióticos (como a penicilina, ampicilina ou eritromicina) pela mãe, e da higiene pessoal com produtos que contenham agentes antimicóticos e antissépticos.

Desta forma, os testes de rastreio no período pré-natal, seguidos de uma gestão adequada dos casos de colonização, apresentam uma relação custo-benefício favorável na prevenção de infecções por *Streptococcus agalactiae* (Beitune *et al*, 2005).

Na Figura 5 está representado o algoritmo aconselhado na colheita e processamento de amostras para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, em mulheres grávidas, entre as 35 e 37 semanas de gestação, segundo as recomendações do CDC.

As amostras devem ser obtidas da zona recto-vaginal, preferencialmente com a mesma zaragatoa. Posteriormente, são colocadas em meio de transporte (Stuart ou Amies), até serem inoculadas num meio selectivo, como o Todd-Hewitt suplementado com antimicrobianos, ou alternativamente, num meio enriquecido com pigmentos cromogénicos, como o meio de Granada. São incubadas durante 18-24 horas, a 35-37°C. Se o SGB não for identificado após a incubação, reincuba-se as placas e examina-se as colónias suspeitas. Os testes de aglutinação em látex ou outros testes para a detecção de SGB podem ser utilizados para uma identificação específica, ou o teste de CAMP pode ser realizado para uma identificação presuntiva da bactéria.

As grávidas que são alérgicas à penicilina, devem avaliar o risco de anafilaxia, e se for considerada de alto risco, devem ser realizados testes de susceptibilidade para a clindamicina e eritromicina.

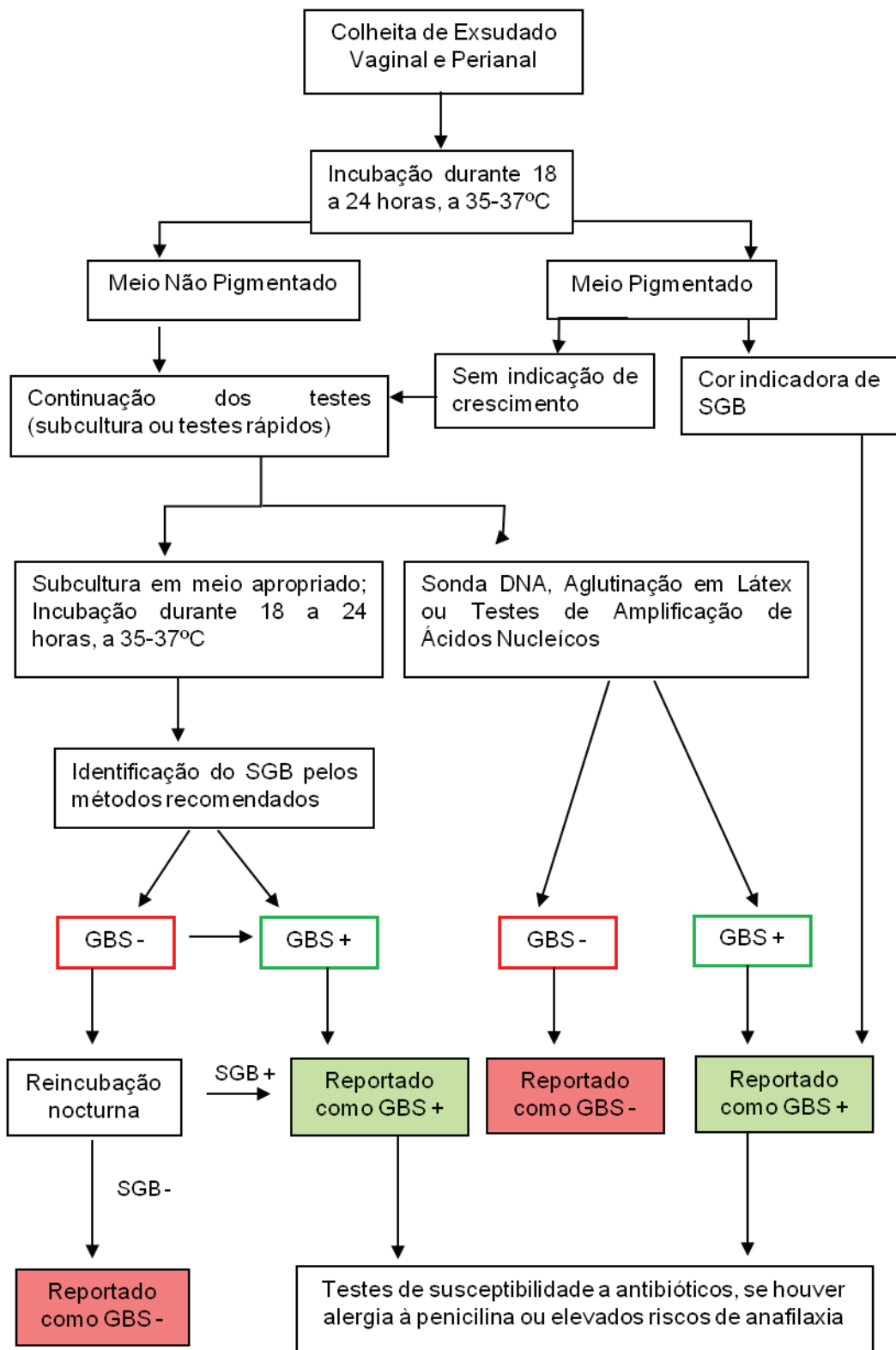


Figura 5: Algoritmo para a pesquisa em laboratório da colonização pré-natal por *Streptococcus agalactiae* (Adaptado de: CDC, 2010)

QUIMIOPROFILAXIA E CONSIDERAÇÕES TERAPÊUTICAS

A prevenção é de extrema importância em áreas de alta incidência de doença invasiva por *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B. É impraticável administrar quimioprofilaxia a todas as grávidas e recém-nascidos. O desafio, portanto, é identificar corretamente os bebês de alto risco, antes do nascimento. A forma mais eficaz de prevenir a infecção neonatal de início precoce é a administração de antibióticos durante o parto. No entanto, não há evidências de que a quimioprofilaxia previna a doença de início tardio (Shet and Ferrieri, 2004; Helali *et al*; CDC, 2010).

A quimioprofilaxia *intrapartum* consiste na administração às gestantes, durante o trabalho de parto, de um antibiótico, sendo o de eleição a penicilina ou a ampicilina. A profilaxia *intrapartum* é tanto mais eficaz quanto mais próxima do início do trabalho de parto for a primeira administração de antibiótico. A via intravenosa (IV) é a única admitida pois permite concentrações intra-amnióticas de antibiótico mais elevadas. É, portanto, a solução provisória de prevenção da doença, enquanto uma vacina não está disponível (Areal *et al*, 2010).

Na década de oitenta foi verificada uma importante diminuição nas taxas de sépsis neonatal com o uso de quimioprofilaxia em gestantes colonizadas por SGB. Em 1996, o CDC elaborou um guia para a prevenção da infecção precoce no recém-nascido. Estas recomendações foram colocadas em prática em 1996, até ao final de 1999, verificando-se uma diminuição de 70% das doenças neonatais de início precoce por *Streptococcus agalactiae*.

A prescrição de quimioprofilaxia foi indicada em duas situações:

- 1) em todas as grávidas colonizadas com SGB, de acordo com os resultados da cultura realizada entre a 35^a e a 37^a semana de gravidez;
- 2) nas grávidas que, não tendo sido submetidas à pesquisa de colonização pelo SGB, apresentam alguns factores de risco para a contaminação da criança.

Apesar de já terem sido mencionados, é importante ter em conta que os factores de risco maternos para a sépsis neonatal são: trabalho de parto prematuro (< 37 semanas de gestação), ruptura prolongada de membranas (> 18 horas), febre no parto (>38°C), história de recém-nascido anterior com doença por SGB, e bacteriúria por SGB durante a gravidez (Bahia and Shahnaz, 2008; Cunningham *et al*, 2005; CDC, 2010).

Em 2010, houve uma revisão das “guidelines” de 2002 do CDC, onde se enfatiza a maior eficácia do protocolo baseado na pesquisa de colonização pelo SGB, quando

comparado com o protocolo baseado nos factores de risco. A abordagem do “screening” de culturas entre as 35 e 37 semanas de gestação é 50% mais efectiva do que a abordagem baseada em factores de risco, pois 30 a 50% dos casos de sépsis desenvolvem-se em recém-nascidos de mães sem factores de risco (Bahia and Shahnaz, 2008). Contudo, esta abordagem apresenta alguns efeitos adversos. A exposição excessiva a antibióticos pode levar a maior resistência ou maior virulência dos agentes patogénicos, reacções alérgicas severas e, eventualmente, a longo prazo, a um desenvolvimento imunológico anormal da criança (Mee-Marquet *et al*, 2009; Helali *et al*, 2009; Aveyard *et al*, 2002).

Estas recomendações foram adoptadas pelo *American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG)* e pela *American Academy of Pediatrics* (Borger *et al*, 2005; Apgar *et al*, 2005; CDC, 2010).

A primeira escolha são os antibióticos β -lactâmicos, uma vez que o *Streptococcus agalactiae* é sensível à maioria desses agentes antimicrobianos. A penicilina G é preferível devido ao seu estreito espectro de acção, esperando diminuir a selecção de microrganismos resistentes, assim como infecções maternas por leveduras. No entanto, aproximadamente 8 a 10% das mulheres grávidas são alérgicas à penicilina, sendo a clindamicina e a eritromicina, alternativas aceitáveis (Muller *et al*, 2010; Beitune *et al*, 2005).

Comparativamente à penicilina, o uso da clindamicina está associado a consideráveis preocupações, tendo em consideração que o *Streptococcus agalactiae* permanece requintadamente sensível à penicilina, mas à clindamicina e eritromicina, a proporção de resistências varia entre 1% e 26%.

As reacções anafiláticas como efeitos adversos do uso de antibióticos também são motivo de preocupação (Shet and Ferrieri, 2004; CDC, 2010).

Portanto, devem ser realizados estudos epidemiológicos para determinar o “cut-off” de colonização por *Streptococcus agalactiae*, para o qual se deve implementar a quimioprofilaxia, e assim otimizar o rácio risco/benefício da mesma (Mee-Marquet, 2009).

ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DA CRIANÇA

Uma criança de termo assintomática cuja mãe tenha recebido quimioprofilaxia adequada (parto depois de 4 ou 5 horas da administração dos antibióticos, de acordo com os intervalos de dosagem recomendados) deve ser observada durante o período neonatal imediato. Para uma criança assintomática com menos de 35 semanas de gestação, ou uma criança cuja mãe tenha recebido uma quimoprofilaxia inadequada, deve ser realizada uma avaliação de diagnóstico limitada (contagem diferencial de leucócitos, hemocultura e radiografia ao peito para detectar anomalias respiratórias), e a criança deve ser observada sem antibioterapia, pelo menos durante 48 horas. Se se desenvolverem sinais de sépsis, deve ser realizada uma avaliação diagnóstica completa (incluindo punção lombar) e deve ser iniciada antibioterapia empírica.

Uma abordagem alternativa é considerar as crianças assintomáticas nascidas de mães com corioamnionite e/ou febre, com alto risco para infecção. Esta abordagem recomenda a avaliação diagnóstica completa e o início de antibioterapia empírica nestas crianças de alto risco.

A associação da ampicilina com um aminoglicosídeo (por exemplo, gentamicina) é o tratamento de eleição inicial para recém-nascidos com infecção invasiva presuntiva por SGB, uma vez que estes fármacos também são activos contra outros microrganismos capazes de causar sépsis neonatal. Esta combinação é sinérgica, para eliminar o SGB e pode ser continuada empiricamente por 48 a 72 horas, até que a infecção por este agente patogénico seja confirmada. Quando a sépsis por *Streptococcus agalactiae*, com ou sem meningite, está firmemente estabelecida, a mesma combinação de antibióticos pode ser continuada durante dez a catorze dias, ou o plano de tratamento pode ser completado com penicilina G ou apenas com ampicilina (Shet and Ferrieri, 2004; CDC, 2010).

PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

Apesar de haver diferentes estratégias para identificar grávidas e recém-nascidos de alto risco, e da prestação de quimioprofilaxia durante o parto, de forma a tentar reduzir a taxa de sépsis neonatal provocada pelo *Streptococcus agalactiae*, é improvável que o problema seja eliminado.

A imunização materna contra o SGB parece ser uma abordagem promissora para a prevenção da sépsis neonatal, prematuridade e baixo peso dos recém-nascidos (Beitune *et al*, 2005).

Estão a ser realizados ensaios clínicos, assim como pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra a doença por *Streptococcus agalactiae*. As vacinas conjugadas de proteínas-polissacarídeo capsular para os serótipos Ia, Ib e III têm demonstrado segurança e eficiência na indução de anticorpos específicos em indivíduos saudáveis vacinados, sugerindo que a vacinação pode trazer mais benefícios comparativamente à quimioprofilaxia, especialmente na redução esperada da doença neonatal de início precoce (Martins *et al*, 2007).

O estudo epidemiológico dos serótipos na população é fundamental para o desenvolvimento de vacinas. Seria de esperar que a formulação da vacina para os serótipos Ia, II, III e V fornecesse protecção a mais de 90% das infecções. O custo do desenvolvimento e a estratégia de implementação da vacina, apesar de elevado, é consideravelmente menor do que o valor gasto no tratamento das infecções, e para algumas crianças, no tratamento de sequelas para o resto da vida (Shet and Ferrieri, 2004; Zaleznik *et al*, 2002; Beitune *et al*, 2005).

Em Janeiro de 2008, a Novartis começou um projecto designado DEVANI (Design of a vaccine to immunize neonates against GBS infections through a durable maternal immune response), com o objectivo de traçar estratégias capazes de induzir a imunização de mulheres contra o *Streptococcus agalactiae*, com transferência placentária da imunidade protectora para o feto. A ideia de que a vacinação das mulheres é uma estratégia eficaz na passagem de anticorpos protectores para os seus filhos, é suportada por vários estudos realizados nos EUA, que sugerem que elevados títulos de anticorpos maternos para polissacarídeos capsulares do SGB se correlacionam com a redução do risco de desenvolver doença nos recém-nascidos.

Os cientistas da Novartis identificaram, em ratinhos de laboratório, três proteínas que conferem a imunização desejada. No entanto, para traduzir esta pesquisa numa

vacina, é necessário realizar completos estudos epidemiológicos sobre morbidade neonatal, assim como sobre o estado de imunização materna.

Por estas razões, o programa DEVANI é financiado pela Comunidade Europeia, e composto por 10 beneficiários, incluindo a Novartis Vacinas e grupos de pesquisa em Itália, Espanha, Bélgica, entre outros países, para entender a distribuição dos serótipos prevalentes do *Streptococcus agalactiae* e seleccionar os mais adequados para a inclusão numa futura vacina. O prazo para finalizar o projecto está estimado para o final de Julho de 2011 (Afshar *et al*, 2011; Novartis, 2010).

Capítulo 2. **OBJECTIVOS**

Objectivos do Estudo:

Uma vez que a infecção por *Streptococcus agalactiae* é um factor importante de morbilidade e mortalidade no recém-nascido, considera-se importante realizar um estudo sobre os casos de colonização de mulheres em idade fértil, na área metropolitana do Porto.

Dessa forma, é possível demonstrar a importância do rastreio deste agente patogénico, para prevenir uma eventual infecção neonatal na nossa população.

Objectivo Geral:

Confirmar a importância do rastreio de *Streptococcus agalactiae* em mulheres grávidas, ou que pretendam engravidar, na zona metropolitana do Porto.

Objectivos Específicos:

- Determinar a incidência de casos de colonização por *Streptococcus agalactiae* em mulheres grávidas, seguidas na Porto Clínica, uma clínica com forte investimento na especialidade de Ginecologia e Obstetrícia;
- Determinar a incidência de casos de colonização por *Streptococcus agalactiae* em mulheres, que por qualquer outro motivo, tenham realizado um exsudado vaginal, estando ou não grávidas;
- Relacionar a colonização por *Streptococcus agalactiae* com a idade da utente.

Capítulo 3. **MATERIAIS E MÉTODOS**

Metodologia:

A formulação dos objectivos do estudo exige a consideração de vários aspectos nomeadamente, o tipo de estudo, a constituição da amostra, assim como o procedimento na recolha de dados.

Este estudo retrospectivo, sem manipulação de condições, teve como base uma abordagem quantitativa, na medida em que se efectuou uma recolha de dados observáveis e quantificáveis, descrevendo um determinado grupo de participantes, grávidas, a quem foi feita a pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, ou não grávidas, cuja identificação deste agente foi, ocasionalmente, obtida na realização de uma análise bacteriológica de um exsudado vaginal.

População e Amostra:

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório Médico de Análises Clínicas Doutor João Pessanha Moreira, no Porto.

A população em estudo são mulheres grávidas, que realizaram o rastreio para a pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, e mulheres, em idade fértil, que realizaram exsudados recto-vaginais, a pedido do clínico, para análise bacteriológica, e onde foi também identificado o *Streptococcus agalactiae*. Dessa forma, ao longo do estudo, diferenciamos dois tipos de análise, para mais facilmente interpretar os resultados e entender a necessidade de um rastreio pré-natal.

As amostras são provenientes, para além do próprio laboratório sediado no Porto, de postos de colheita localizados em Alfena, Alvarelhos, Foz, Gondomar, São Pedro da Cova, Santo Tirso, Trofa e Valbom, e de uma clínica localizada no Porto, a Porto Clínica, cujas amostras da especialidade Ginecologia e Obstetrícia são reencaminhadas para o referido laboratório principal.

A amostra deste estudo é constituída por 195 mulheres, entre as quais, 47 realizaram um rastreio específico de *Streptococcus agalactiae*, e as restantes 148 realizaram uma análise bacteriológica do exsudado vaginal. A população em estudo apresentava idades compreendidas entre os 14 e os 50 anos, considerando-se este o intervalo relativo à idade fértil de uma mulher (aproximadamente), como se pode observar pela análise da Tabela 3 e 4.

Os dados recolhidos foram obtidos no período de tempo entre Janeiro de 2009 e Abril de 2011.

Tabela 3: Número e percentagem de mulheres, segundo a classe etária, que realizaram uma análise bacteriológica do exsudado vaginal, entre 2009 e 2011

Exsudados recto-vaginais		Anos					
		2009		2010		2011	
		n	%	n	%	n	%
Classe etária	14-20	9	15,3	6	10,0	1	3,5
	21-30	20	33,9	16	26,7	7	24,1
	31-40	19	32,2	21	35,0	18	62,1
	41-50	11	18,6	17	28,3	3	10,3

Tabela 4: Número e percentagem de mulheres, segundo a classe etária, que realizaram uma pesquisa específica para o *Streptococcus agalactiae*, entre 2009 e 2011

Análise específica para <i>Streptococcus agalactiae</i>		Anos					
		2009		2010		2011	
		n	%	n	%	n	%
Classe etária	14-20	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	21-30	2	15,4	11	55,0	3	21,4
	31-40	8	61,5	8	40,0	11	78,6
	41-50	3	23,1	1	5,0	0	0,0

Colheita e Processamento da Amostra:

Este trabalho consistiu na análise dos resultados, obtidos a partir de exsudados vaginais e perianais de mulheres em idade fértil.

Apesar de, na literatura ser normalmente mencionado exsudado recto-vaginal, será mais correcto referir exsudado vaginal e perianal, uma vez que são estas as zonas anatómicas de recolha da amostra, se tivermos em conta o procedimento realizado pelos clínicos e pelos laboratórios de análises clínicas.

As amostras de exsudado foram colhidas com zaragatoa e enviadas para o laboratório central, sediado no Porto, em meio de transporte de Stuart (Figura 6).

O meio de Stuart permite a manutenção e o transporte de um grande número de microrganismos patogénicos, entre os quais o *Streptococcus spp.*. Este meio contém tioglicolato que dificulta as reacções enzimáticas de autólise. Após a colheita do material biológico, a zaragatoa é introduzida no tubo com a extremidade de algodão imersa no meio de Stuart (Labset, 2007).



Figura 6: Meio de transporte de Stuart, composto por zaragatoa e tubo fechado, contendo o meio (Adaptado de: Labset, 2007)

Depois de chegar ao laboratório, as zaragatoas foram introduzidas em meio líquido selectivo de Todd-Hewitt e incubadas 24 horas a 37°C. Este meio é altamente nutritivo devido ao seu conteúdo em peptonas, dextrose e sais. A dextrose estimula a produção de hemolisina. O fosfato de sódio e o carbonato de sódio funcionam como tampões para contrariar a acidez produzida durante a fermentação da dextrose, protegendo assim a hemolisina da inactivação pela acidez. A selectividade para SGB é

obtida mediante a inclusão de gentamicina e ácido nalidíxico no meio. Dessa forma, este meio permite a proliferação de SGB, inibindo simultaneamente a proliferação de contaminantes (Becton, 2006).

Posteriormente, foi realizada a sementeira em gelose de sangue e incubada nas mesmas condições, com disco de SXT (Trimetoprim-Sulfametoxazol) que vai inibir o crescimento de algumas bactérias, mas não inibe o SGB, uma vez que é resistente a estes antibióticos.

Quando foram observadas colónias sugestivas de *Streptococcus agalactiae*, procedeu-se à sua identificação e antibiograma.

Recolha de Dados:

Tratando-se de um estudo retrospectivo, foram recolhidos dados das utentes desde 1 de Janeiro de 2009 a 30 de Abril de 2011.

Estes dados foram obtidos a partir do uso do “software” do Laboratório Médico de Análises Clínicas Doutor João Pessanha Moreira, que utiliza o programa informático da MAXDATA: CLINIDATA XXI – versão 4.0. Trata-se de um sistema completo de gestão de laboratórios de análises clínicas.

Esta pesquisa implicou a utilização de alguns filtros que o programa dispõe, entre os quais, “Listagem de Doentes”, “Data da Colheita”, “Idade”, “Sexo”, “Gravidez” e “Tipo de Análise”, assim como o cruzamento dos dados obtidos.

Durante a análise de resultados surgiram algumas dúvidas pois as informações clínicas que o laboratório dispõe, por vezes são insuficientes, sendo necessário consultar o histórico da utente, quando está disponível.

Mesmo assim, não foi possível esclarecer todas as questões, nomeadamente se as utentes que realizaram a análise bacteriológica do exsudado vaginal, estavam ou não grávidas no momento da colheita.

Capítulo 4. **RESULTADOS**

Relativamente à análise bacteriológica dos exsudados vaginais, foram realizados em 148 mulheres em idade fértil. Esta análise foi pedida pelo clínico como um rastreio bacteriológico, e não especificamente para pesquisar o *Streptococcus agalactiae*. Como se pode observar nos seguintes gráficos, 23% dos exsudados realizados deram um resultado positivo, ou seja, a mulher estava colonizada com um microrganismo, que segundo a informação do laboratório, poderia ser *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas sp.* ou *Streptococcus agalactiae*.

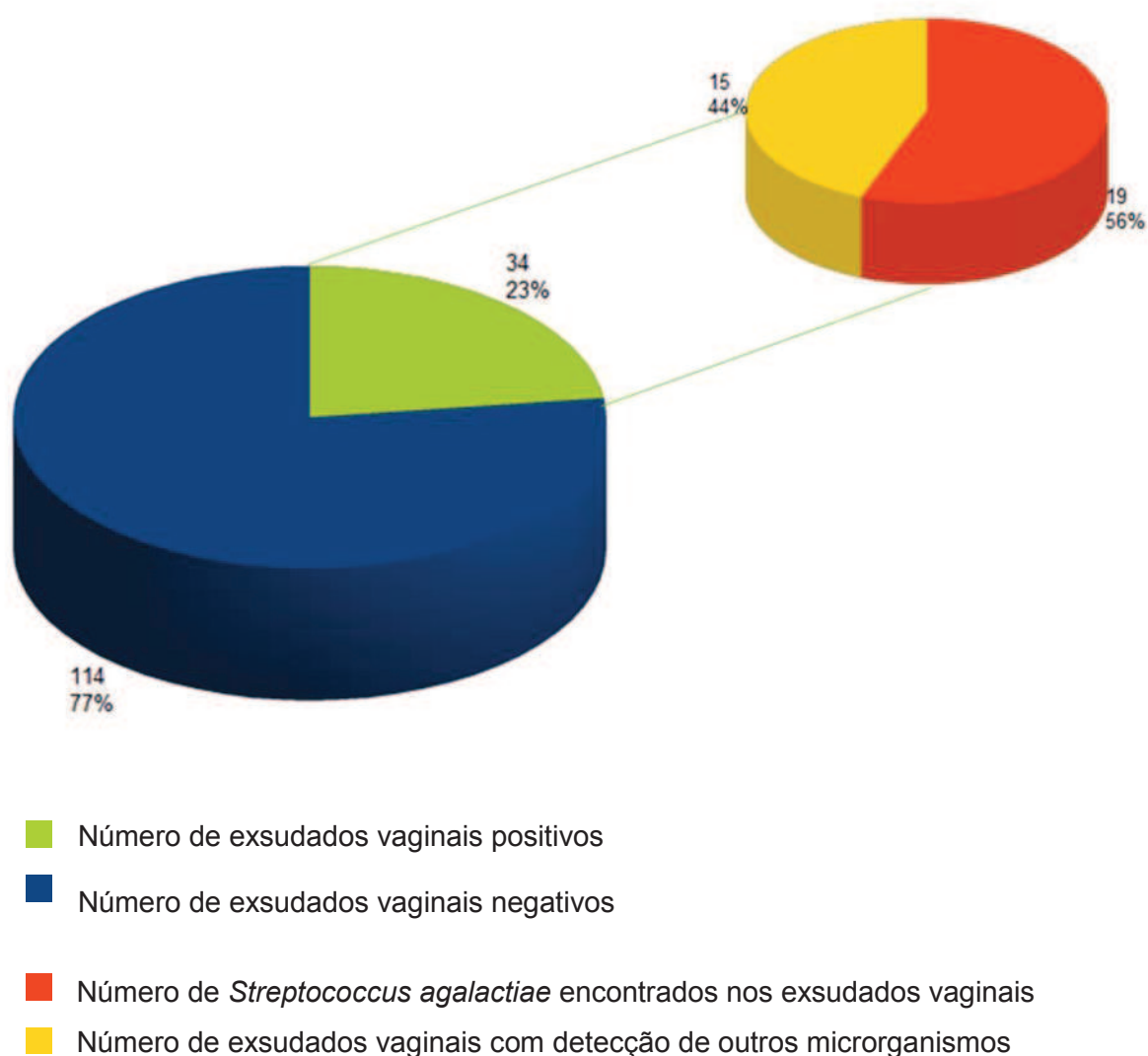


Figura 7: Relação dos resultados obtidos nos exsudados vaginais das mulheres em idade fértil, no período de tempo de 2009 a 2011

Da análise dos gráficos da Figura 7 pode-se observar que, mais de metade da análise bacteriológica dos exsudados positivos (23%), apresentavam colonização com o *Streptococcus agalactiae* (56%). É portanto, uma taxa elevada de colonização das mulheres em idade fértil, correspondendo aos dados da literatura, justificando-se, dessa forma, a necessidade da realização de um rastreio pré-natal.

No que diz respeito ao universo de mulheres que realizaram uma análise bacteriológica do exsudado vaginal e estão colonizadas com *Streptococcus agalactiae* (13% do total das mulheres), na Figura 8 estão divididas em classes etárias, havendo uma predominante incidência das classe de idades entre os 21 e os 40 anos de idade.

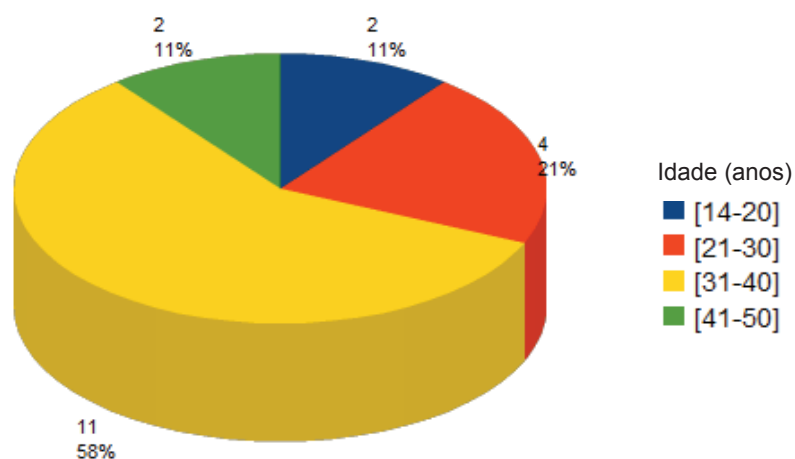


Figura 8: Incidência da colonização por *Streptococcus agalactiae*, nos diferentes grupos etários, no período de tempo de 2009 a 2011

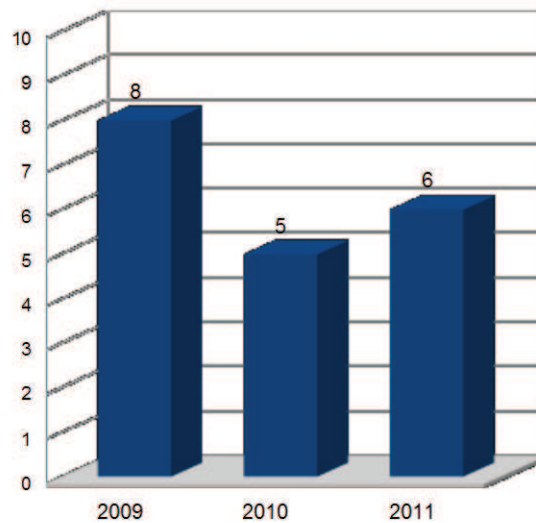


Figura 9: Resultado dos exsudados com colonização positiva para o *Streptococcus agalactiae*, nos diferentes anos em que decorreu o estudo

Pelos resultados obtidos, pode observar-se que, dos exsudados vaginais positivos, das mulheres em idade fértil, mais de metade estavam colonizadas com *Streptococcus agalactiae*, e sem um pedido específico pelo clínico para a detecção deste agente patogénico.

É também possível constatar que 13% da população feminina em idade fértil está colonizada pelo *Streptococcus agalactiae*, sendo um dado relevante para a implementação de rastreios pré-natais obrigatórios.

Posteriormente, poderá observar-se os resultados de uma segunda análise, um pedido específico de pesquisa de *Streptococcus agalactiae*, em mulheres grávidas, entre os 14 e os 50 anos de idade.

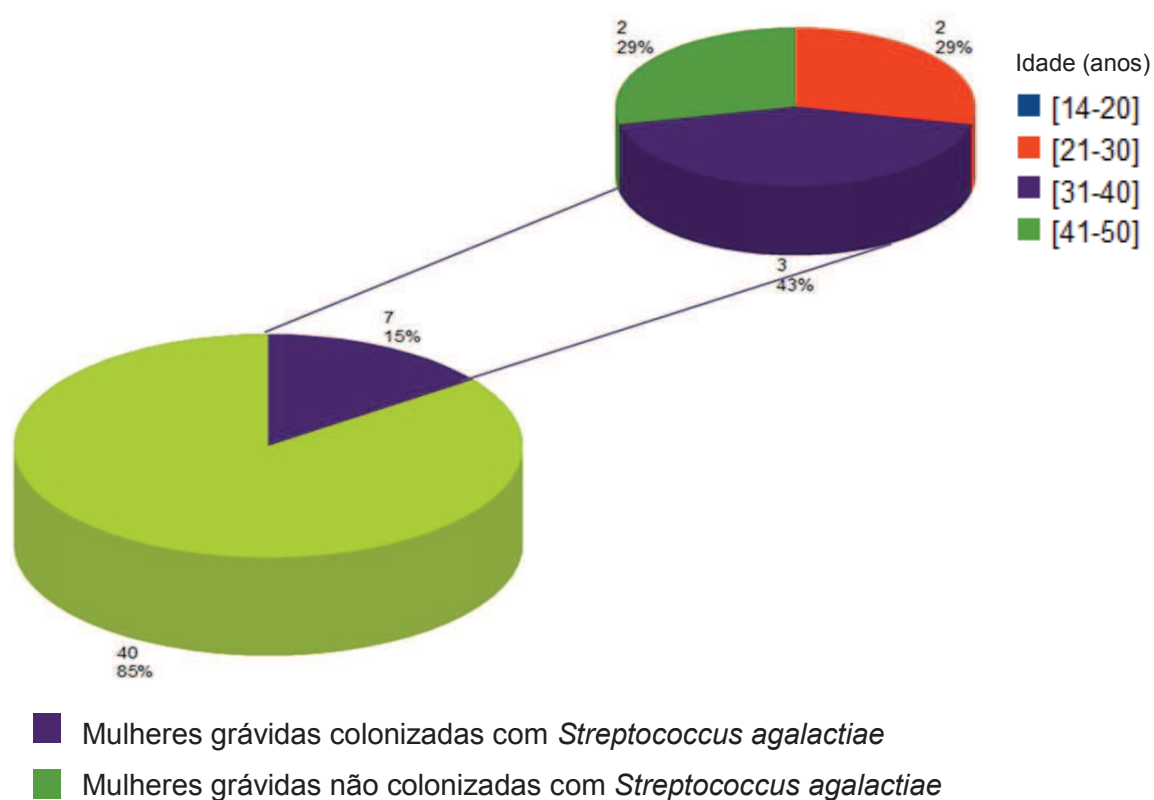


Figura 10: Resultados da análise específica de colonização por *Streptococcus agalactiae*, em mulheres grávidas, e segundo os diferentes grupos etários

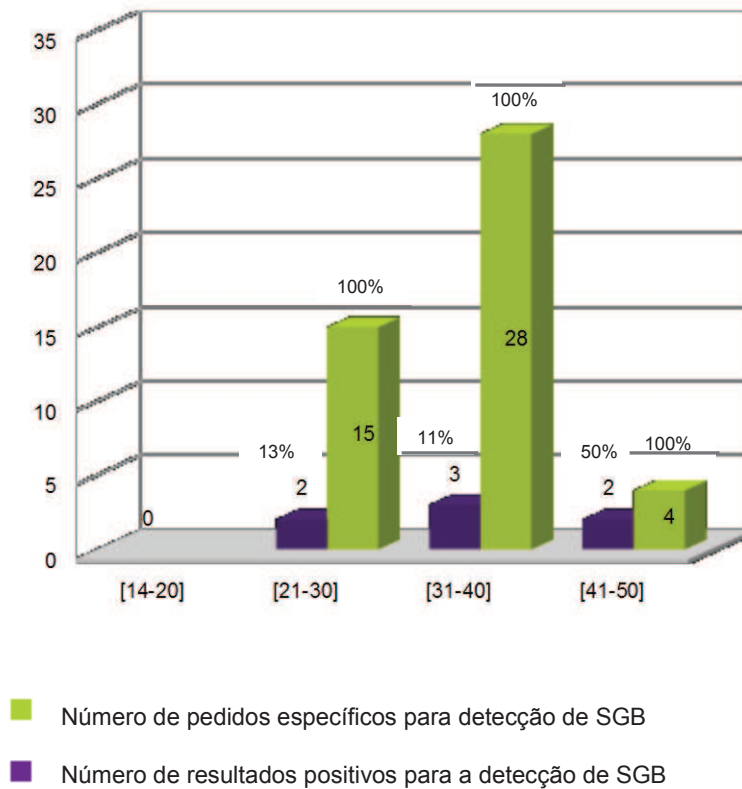


Figura 11: Relação dos resultados positivos da análise específica de colonização por *Streptococcus agalactiae*, em mulheres grávidas, com o número de análises realizadas, nos diferentes grupos etários

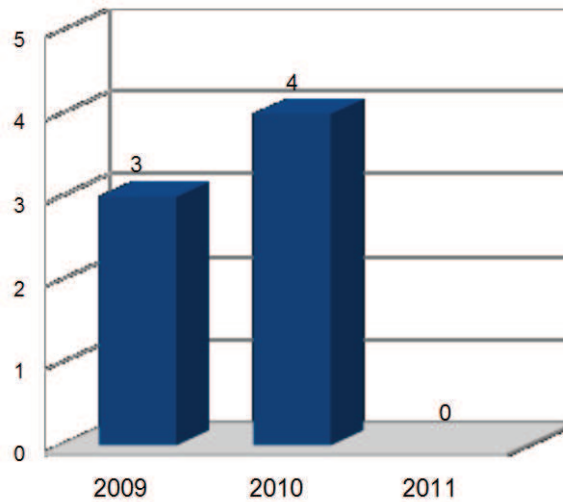


Figura 12: Resultados das pesquisas positivas específicas para *Streptococcus agalactiae*, nos diferentes anos em que decorreu o estudo

Com base nos dados apresentados, é possível observar que 15% das mulheres grávidas que efectuaram o rastreio específico do *Streptococcus agalactiae*, estavam colonizadas com este agente patogénico, e que havia um maior número de grávidas colonizadas entre os 31 e os 40 anos (43%). No entanto, se observarmos a relação das grávidas colonizadas com as que realizaram o rastreio, em cada classe etária, concluímos que 50% da faixa etária dos 41 aos 50 anos estava colonizada.

Capítulo 5. **DISCUSSÃO**

Na década de setenta, emergiram os primeiros estudos sobre *Streptococcus agalactiae* que apontavam este microrganismo como uma importante causa de septicemia e meningite neonatal (Baker and Barret, 1974). Desde então, inúmeras pesquisas evidenciaram este agente como causador de septicemia em recém-nascidos e defendem a prevenção da colonização neonatal como a principal forma de redução dessa grave infecção (Schuchat, 1998).

De acordo com a literatura, aproximadamente 10 a 30% das grávidas estão colonizadas com *Streptococcus agalactiae*. Contudo, a grande variação das taxas de incidência de colonização deve-se a variados factores como o tempo de gestação no momento em que as colheitas são realizadas, o local da colheita, os métodos bacteriológicos utilizados para a detecção do SGB e a origem e características da população estudada (Areal *et al*, 2010).

O *Streptococcus agalactiae* é o principal agente etiológico de sépsis neonatal precoce, a qual tem uma frequência entre 1 a 4/1000 recém-nascidos, e uma mortalidade estimada entre 5 e 20% (Díaz and Nieves, 2008).

O rastreio bacteriológico de *Streptococcus agalactiae* não é considerado pela Direcção Geral de Saúde uma análise obrigatória durante a vigilância da gestação, contudo é recomendado por alguns clínicos, de acordo com as directrizes do CDC.

Dessa forma, a necessidade de conhecer a incidência da colonização pelo *Streptococcus agalactiae*, de mulheres em idade fértil, é essencial.

No presente trabalho foi realizado um estudo retrospectivo, onde foram avaliados dados obtidos no Laboratório Médico de Análises Clínicas Doutor João Pessanha Moreira, entre Janeiro de 2009 e Abril de 2011, na área metropolitana do Porto.

A amostra em estudo foi constituída por 195 mulheres, entre as quais, 47 grávidas que realizaram um rastreio específico de *Streptococcus agalactiae*, e as restantes 148 mulheres, em idade fértil, que efectuaram rastreio bacteriológico dos exsudados vaginais, podendo ou não estar grávidas.

Verificou-se que a incidência da colonização desse agente patogénico nas mulheres que realizaram o exsudado vaginal foi de 13%, e nas grávidas que efectuaram uma pesquisa específica do *Streptococcus agalactiae* foi de 15%. Estas percentagens podem ser traduzidas no número de recém-nascidos que poderiam nascer colonizados com esta bactéria, e mais tarde, desenvolver sequelas graves e irreversíveis.

A população em estudo apresentava idades compreendidas entre os 14 e os 50 anos, havendo em ambos os casos uma maior incidência de colonização no grupo etário dos 31 aos 40 anos.

Seria interessante saber o tempo de gestação das grávidas que participaram no estudo, a fim de entender se estavam no final da gravidez, pois desta forma, se estivessem colonizadas, seriam candidatas a receber quimioprofilaxia *intrapartum*.

É evidente que os dados seriam ainda mais representativos se a amostra fosse mais ampla, no entanto, os resultados obtidos são relevantes, uma vez que a percentagem de colonização das mulheres em idade fértil justifica a sua detecção, estando de acordo com a bibliografia (Borger *et al*, 2005; Beitune *et al*, 2004; Faro *et al*, 2010).

Podemos assim concluir que estes dados justificam a necessidade de realização do rastreio pré-natal de colonização por *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B, em mulheres em idade fértil.

Capítulo 6. **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos são suficientes para fazer perceber que o grupo de mulheres com idades entre os 31 e os 40 anos apresenta uma alta incidência de colonização por *Streptococcus agalactiae*, e que a realidade da zona metropolitana do Porto está de acordo com a realidade mundial.

Em 2011, durante o tempo em que decorreu o estudo (4 meses), nenhuma grávida teve um resultado positivo no rastreio da colonização por *Streptococcus agalactiae*, havendo assim uma evidente diminuição da incidência da colonização, relativamente aos anos anteriores. O número de grávidas que realizaram o rastreio para esta bactéria, tem aumentado ligeiramente ao longo dos anos.

É importante referenciar que, mesmo as mulheres que não estavam grávidas, apresentam uma taxa significativa de colonização por este agente (13%), e estando em idade fértil, esse facto pode constituir um factor de risco para a transmissão vertical do *Streptococcus agalactiae* ao feto.

É, portanto, importante detectar a colonização por *Streptococcus agalactiae* devido às complicações ginecológicas e obstétricas que este agente patogénico pode provocar. A consequência da colonização do recém-nascido pode ser tão grave, que é sem dúvida, preferível investir na sua prevenção.

Assim, e em função destes resultados, à semelhança de outros estudos, é recomendável a instituição do rastreio universal das grávidas e de outras mulheres que pretendam engravidar, assim como a profilaxia adequada, quando indicado. No entanto, é necessário monitorizar as potenciais consequências adversas do uso de antibióticos *intrapartum* devido à emergência da resistência bacteriana e do maior número e gravidade das infecções neonatais por outros agentes que não o *Streptococcus agalactiae*.

Uma vez que a colonização materna com este microrganismo é um factor chave para a ocorrência de altas taxas de morbilidade e mortalidade neonatal, justifica-se a adopção de medidas preventivas de sépsis neonatal por *Streptococcus* β -hemolítico do grupo B (nomeadamente o rastreio pré-natal) e outras patologias associadas de elevada gravidade, tendo em conta a colonização da população feminina, em idade fértil, na zona metropolitana do Porto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afshar B, Vickers A, Morton K, Demertzi E, Hassan I, Stock S, et al. DEVANI UK clinical screening study for maternal carriage of *Streptococcus agalactiae*. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2011 May 7-10; Milan, Italy.

Aila NE, Tency I, Claeys G, Saerens B, Cools P, Verstraelen H, et al. Comparison of different sampling techniques and of different culture methods for detection of group B *streptococcus* carriage in pregnant women. BMC Infectious Diseases. 2010;10:285.

Aila NE, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Deschaght P, Decat D, et al. Comparison of culture with two different qPCR assays for detection of vaginal e perianal carriage of *Streptococcus agalactiae*. 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2011 May 7-10; Milan, Italy.

Alfa MJ, Sepehri S, Gagne PD, Helawa M, Sandhu G, Harding GKM. Real-Time PCR Assay Provides Reliable Assessment of Intrapartum Carriage of Group B *Streptococcus*. Journal of Clinical Microbiology. 2010 Sep;48(4):3095-3099.

Almeida A, Agro J, Ferreira L. Estreptococcus β -hemolítico do grupo B: Protocolo de Rastreio e Prevenção de Doença Perinatal. Consensos em Neonatologia, Secção de Neonatologia da Sociedade Portuguesa de Pediatria. 2004.

American Society for Microbiology [Internet]. *Streptococcus agalactiae*; 2007 Jun. Disponível em: <http://archive.microbelibrary.org/asmonly/details.asp?id=2424> [acedido em 23/05/2011].

American Society for Microbiology [Internet]. CAMP Test for the Identification of β -Hemolytic *Streptococcus agalactiae* (Group B); 2006 Sep. Disponível em: <http://archive.microbelibrary.org/ASMOOnly/details.asp?id=2333&Lang> [acedido em 23/05/2011].

Apgar BS, Greenberg G, Yen G. Prevention of group B Streptococcal Disease in the Newborn. American Family Physician. 2005;71(5):903-10.

Areal A, Nunes S, Moreira M, Faustino MA, Cardoso L, Sá C. Infecção perinatal por *Streptococcus agalactiae* pode ser evitada: Prevalência da colonização em parturientes

no Hospital São Marcos, factores de risco e a sua relação com a infecção perinatal. Acta Pediátrica Portuguesa. 2010;41(1):16-21.

Areal AM. Impacto do rastreio de *Streptococcus agalactiae* na infecção neonatal [dissertação]. Aveiro: Universidade de Aveiro - Departamento de Biologia; 2009.

Aveyard P, Cheng KK, Manaseki S, Gardosi J. The risk of preterm delivery in women from different ethnic groups. BJOG. 2002; 109:8894-9.

Bahia NJ, Shahnaz P. The Prevalence and Adverse Effects of Group B Streptococcal Colonization during Pregnancy. Archives of Iranian Medicine. 2008 Nov;11(6):654-657.

Baker CJ, Barrett FF. Group B Streptococcal Infections in Infants: The importance of the various serotypes. JAMA. 1974;230(8):1158-60.

Baron EJ [Internet]. Beta Hemolytic Streptococci; 2007. Disponível em: <http://antimicrobe.org/ClinicMicro/Beta%20strep1.htm> [acedido em 12/06/2011].

Bectone, Dickinson and Company. Todd Hewitt Broth with Gentamicin and Nalidixic Acid. Procedimentos de Controlo de Qualidade. 2006 Oct; (4).

Beitune PE, Duarte G, Maffei CML. Colonization by *Streptococcus agalactiae* During Pregnancy: Maternal and Perinatal Prognosis. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2005;9(3):276-282.

Borger IL, Oliveira REC, Castro ACD, Mondino SSB. *Streptococcus agalactiae* em gestantes: prevalência de colonização e avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 2005 Oct;27(10).

Centers for Disease Control. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised Guidelines from CDC. Morb Mortal Wkly Rep. 2010 Nov;59:1-36.

Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Hauth JC, Gilstrap II LC, Wenstrom KD. Williams Obstetrics. 22nd edition. New York: McGraw-Hill; 2005:1284-1299.

Das A, Ray P, Sharma M, Gopalan S. Rapid diagnosis of vaginal carriage of group B beta hemolytic *streptococcus* by an enrichment-cum-antigen detection test. Indian J Med Res. 2003;117:247-52.

Díaz TM, Nieves BM. Comparación de medios de cultivos y procedimientos para detectar colonización por *Streptococcus agalactiae* em mujeres embarazadas. Rev Chil Infect. 2008;25(2):108-113.

Edwards MS. Group B Streptococcal conjugate vaccine a timely concept for which the time has come. Human Vaccines. 2008;4(6):444-8.

Farley MM. Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. Clinical Infectious Diseases. 2001; 33:556-61.

Faro S, Brehm B, Smith F, Mouzoon M, Greisinger A, Wehmanen O, et al. Screening for Group B Streptococcus: A Private Hospital's Experience. Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 2010 May.

Fry RM. Fatal infections by hemolytic *streptococcus* group B. Lancet. 1938;199-201.

Harrison LH, Elliott JA, Dwyer DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, et al. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: Implications for Vaccine Formulation. Maryland Emerging Infections Program. Journal of Infectious Diseases. 1998;177(4):998-1002.

Helali NE, Nguyen JC, Ly A, Giovangrandi Y, Trinquart L. Diagnostic Accuracy of a Rapid Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Universal *Intrapartum* Group B *Streptococcus* Screening. Clinical Infectious Diseases. 2009; 49:417-23.

Jackson LA, Hilsdon R, Farley MM, Harrison LH, Reingold AL, Plikaytis BD, et al. Risk factors for Group B Streptococcal disease in adults. Ann Intern Med. 1995; 123:415-20.

Joachim A, Matee MI, Massawe FA, Lyamuya EF. Maternal and neonatal colonization of group B *streptococcus* at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania: prevalence, risk factors and antimicrobial resistance. BMC Public Health. 2009 Dec;9:437.

Labset [Internet]. Zaragatoas estéreis com meio para transporte Stuart; 2007. Disponível em:http://labset.biostrument.com/index.php?target=products&product_id=9680 [acedido em 8/03/2011].

Martins ER, Pessanha MA, Ramirez M, Melo-Cristino J. Analysis of Group B Streptococcal Isolates from Infants and Pregnant Women in Portugal Revealing Two Lineages with Enhanced Invasiveness. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007 Oct;3224-3229.

Mee-Marquet N, Jouannet C, Domelier AS, Arnault L, Lartigue MF, Quentin R. Genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* strains and density of vaginal carriage. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58:169-173.

Muller AE, Mouton JW, Oostvogel PM, Dorr PJ, Voskuyl RA, DeJongh J, et al. Pharmacokinetics of Clindamycin in Pregnant Women in the Peripartum Period. *American Society for Microbiology - Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 May;54(5):2175-2181.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*. 5ª ed. Guanabara Koogan; 2006.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH. *Manual of Clinical Microbiology*. 9ª ed. ASM PRESS; 2007. p.412-15.

Novartis Vaccines & Diagnostics [Internet]. DEVANI - Design of a vaccine to immunize neonates against GBS infections through a durable maternal immune response; 2010 Nov. Disponível em: <http://www.devaniproject.org/index.html> [acedido em 25/05/2011].

Pass MA, Gray BM, Khare S, Dillon HC. Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. *The Journals of Pediatrics*. 1979 Sep;95(3):437-43.

Remel [Internet]. Teste de aglutinação em látex – marca Streptex ®. Disponível em: <http://www.remel.com/Clinical/DiagnosticTests/Streptex.aspx> [acedido em 23/05/2011].

Ruoff KL, Whiley RA, Beighton D. *Streptococcus*. Manual of Clinical Microbiology. 8^a ed. American Society of Microbiology, Washington, DC. 2003;405-421.

Schuchat A. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11:497-513.

Shet A, Ferrieri P. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: A comprehensive review. *Indian J Med Res*. 2004 Sep;120:141-150.

Zaleznik DF, Rench MA, Hillier S, Krohn MA, Platt R, Lee MT, et al. Invasive disease due to group B *Streptococcus* in pregnant women and neonates from diverse population groups. *Clinical Infectious Diseases*. 2000 Feb;30(2):276-81.